



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LOUISE MAGALHÃES ALBUQUERQUE**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PEROXIDASE ORIUNDA  
DE RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E  
PROSPECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E REMOVEDORA DE FENÓIS**

**FORTALEZA**

**2017**

LOUISE MAGALHÃES ALBUQUERQUE

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PEROXIDASE ORIUNDA DE  
RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E PROSPECÇÃO DE  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E REMOVEDORA DE FENÓIS

Monografia submetida à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A311p Albuquerque, Louise Magalhães.  
Purificação e caracterização de uma nova peroxidase oriunda de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e prospecção de atividade antifúngica e removedora de fenóis / Louise Magalhães Albuquerque. – 2017.  
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

1. Leguminosae. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. *Vigna unguiculata*. 4. *Colletotrichum gloeosporioides*. 5. *Fusarium oxysporum*. I. Título.

CDD 570

---

LOUISE MAGALHÃES ALBUQUERQUE

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA PEROXIDASE ORIUNDA DE  
RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [Vigna unguiculata (L.) WALP.] E PROSPECÇÃO DE  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E REMOVEDORA DE FENÓIS

Monografia apresentada ao curso de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
do Ceará como parte dos requisitos para ob-  
tenção de grau de Bacharel em Ciências Bio-  
lógicas.

Aprovada em 14/12/2017

BAÑCA EXAMINADORA

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Thiago Fernandes Martins

Pro. Dr. José Tadeu Azevedo de Oliveira (Orientador) Universidade  
Federal do Ceará (UFC)

M. Thiago Fernandes Martins  
Universidade Federal do Ceará

Dr. Fabiano de Moura Teixeira  
Universidade Federal do Ceará

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mesmo com todas as dificuldades que tenho, ter me atribuído força para enfrentar as várias adversidades surgidas ao longo do percurso ao qual me submeti durante esses anos de vida acadêmica.

Também, à minha família (papai, mamãe, minha irmã Belinha), que me dão bastante apoio e suporte desde sempre, várias vezes estando de prontidão oferecendo ajuda quando viam que eu parecia precisar.

Ao professor Tadeu que foi meu orientador deste trabalho, mas, que ao mesmo tempo, me passou muito conhecimento e experiência também para a vida.

Ao Dr. Fabiano pela disponibilidade de participar da banca examinadora, mesmo que por um convite repentino.

Ao Thiago, meu co-orientador e amigo, que acreditou no meu potencial, sempre procurando dar o melhor dele, me orientando com "bastante paciência" (posso por aspas tamanho 40, ABNT?).

Ao Fredy, também por sua ótima co-orientação e participação importante em ensaios determinantes para a conclusão deste trabalho.

Também à minha colega de laboratório e amiga, Jordanya, com quem passei por muita coisa junto, principalmente, durante o estágio, e que em meio a todos os problemas que surgiram, nossa amizade cresceu, visto que sempre me deu suporte e esteve disposta a me ajudar.

Aos demais integrantes do LPVD (Ana Lídia, Ana Lu, Bárbara, Dhel, Handerson, Ivna, Larissa, Luca, Manel, Queilane, Raíssa e Rodolpho) pela amizade e forma cooperativa de agir no ambiente de trabalho.

Às minhas amigas da universidade, Alexya, Júlia, Thais e Thuany, que me proporcionaram bons momentos durante o curso, além de sempre procurarem ser compreensivas perante meu afastamento, devido aos deveres, principalmente, do estágio.

Aos meus outros amigos, como Jessica, minha amiga de infância que prestou o mesmo curso que eu, fornecendo, várias vezes, boas dicas sobre; como, novamente, minha irmã Belinha, que é muito importante para mim; e como Igor que apareceu em uma fase difícil da minha vida, a tornando menos pesada, sempre sendo bastante prestativo comigo e com minha família.

## RESUMO

As peroxidases (POXs) são enzimas capazes de catalisar a oxidação de uma miríade de substratos e desempenham funções importantes na defesa vegetal contra patógenos, atuando na eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e biossíntese de lignina. Além disso, as POXs são de grande interesse, uma vez que podem ser aplicadas na medicina, agricultura e na biotecnologia, como biossensores. Neste trabalho uma peroxidase foi purificada a partir das raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) do genótipo TE97-411-1F. Após a extração de proteínas solúveis totais com tampão acetato de sódio, 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl, seguido da precipitação com sulfato de amônio (0-90% de saturação), a fração obtida (F0/90) foi aplicada em coluna cromatográfica tendo quitina como fase estacionária, ficando a atividade peroxidásica concentrada no pico não retido (PNRQ). O PNRQ foi cromatografado em coluna de troca iônica, e a peroxidase de interesse, denominada POX100, purificada após eluição com 0,1 M de NaCl, como verificado por SDS-PAGE. Análise por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF) indicou alta similaridade entre a POX100 e peroxidases de outras leguminosas. Análises da proteína pura indicaram que a POX100 é uma glicoproteína composta por uma única cadeia polipeptídica de 58 kDa, com pI = 3,79. Exibiu excelente estabilidade térmica até à temperatura de 60 °C, durante 120 minutos de tratamento. Seu ótimo de atividade enzimática foi obtido em pH=6,0, usando guaiacol como substrato. Em ensaios *in vitro* de remoção de compostos fenólicos, foi obtido degradação de 48% do guaiacol após 1 h de reação. Em ensaio na presença de íons e aditivos foi observada significativo aumento de atividade na presença de EDTA, e significativa inibição por DTT, Azida de Sódio e Bissulfito de sódio. Além disso, foi avaliado o seu potencial antifúngico, observando-se leve atividade inibitória do crescimento vegetativo dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*.

**Palavras-chave:** *Leguminosae*, Peróxido de hidrogênio, *Vigna unguiculata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*.

## ABSTRACT

Peroxidases (POXs) are enzymes that catalyze the oxidation of a variety of substrates and play important functions in plant defense against pathogens, acting on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and lignin biosynthesis. Because of their broad applicability in medicine, agriculture and biotechnology as biosensor systems, POXs became significantly relevant. In this work, a peroxidase was purified from cowpea (*Vigna unguiculata*) roots of genotype TE97-411-1F. After total soluble proteins extraction with 0.05 M sodium acetate buffer pH 5.2, containing 0,15 M NaCl, followed by ammonium sulfate precipitation (0-90% saturation), the obtained fraction (F0/90) was inserted in a chromatography column containing chitin as stationary phase, by which the peroxidase activity was concentrated on the non-retained peak (PNRQ). The PNRQ was loaded in an ion exchange column, and the peroxidase of interest, denominated POX100, was purified after been eluted with 0,1 M NaCl, as shown by SDS-PAGE. Analysis by mass spectrometry (ESI-QUAD-TOF) indicated a high similarity between the POX100 and others leguminous peroxidases. An analysis of a pure protein showed that POX100 is a glycoprotein composed by a single 58 kDa polipeptidic chain, with IEP = 3,79. It presented an excellent thermal stability up to 60°C, during 120 minutes of treatment. Its high enzymatic activity, using guaiacol as substrate, was achieved at pH 6.0. *In vitro* phenolic compounds removal assays, the degradation of 48% of guaiacol was observed within 1 h of reaction. On the assay with presence of ions and additives, significant enhancement of the activity in the presence of EDTA and significant inhibition by DTT, Sodium Azide and Sodium Bisulfite were noticed. Furthermore, the analysis of antifungal potential exhibited a mild inhibitory activity of the vegetative growth of phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*.

**Keywords:** *Leguminosae*, Hydrogen peroxide, *Vigna unguiculata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Heme Peroxidases.....	10
2.1.1 <i>Classes de heme peroxidases</i> .....	13
2.1.2 <i>Peroxidases Vegetais</i> .....	14
2.1.3 <i>Peroxidases na indústria</i> .....	15
2.2 Feijão-de-corda.....	16
2.3 Fungos fitopatogênicos.....	18
2.4 Objetivos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Reagentes.....	22
4.2 Material biológico.....	22
4.2.1 <i>Sementes de feijão-de-corda [Vigna unguiculata (L.) Walp.]</i> .....	22
4.2.2 <i>Fungos fitopatogênicos</i> .....	22
4.3 Germinação das sementes e manutenção das plantas.....	23
4.4 Coleta do material vegetal e preparação do extrato proteico total.....	23
4.5 Purificação da peroxidase de raízes de <i>V. unguiculata</i> .....	24
4.5.1 <i>Precipitação por sulfato de amônio</i> .....	24
4.5.2 <i>Cromatografia de afinidade a quitina</i> .....	24
4.5.3 <i>Cromatografia de troca iônica</i> .....	24
4.6 Caracterização bioquímica da peroxidase.....	25
4.6.1 <i>Dosagem de proteínas solúveis totais</i> .....	25
4.6.2 <i>Determinação da atividade peroxidásica</i> .....	25
4.6.3 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i> .....	26
4.6.4 <i>Revelação por nitrato de prata</i> .....	26
4.6.5 <i>Zimografia</i> .....	27
4.6.6 <i>Detecção de carboidratos ligados covalentemente à POX100</i> .....	27
4.6.7 <i>Determinação do ponto isoelétrico (pI) da POX100</i> .....	28
4.6.8 <i>Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal</i> .....	28
4.6.9 <i>Espectrometria de Massas</i> .....	29
4.6.10 <i>Avaliação da temperatura ótima da atividade peroxidásica</i> .....	29



4.6.11 Avaliação da termoestabilidade da POX100 .....	30
4.6.12 Avaliação do pH ótimo da atividade peroxidásica .....	30
4.6.13 Cinética enzimática da POX100.....	30
4.6.14 Efeito de aditivos e sais sobre a atividade peroxidásica da POX100 .....	30
4.7 Atividade de remoção de fenóis .....	31
4.8 Atividade biológica .....	31
4.8.1 Cultivo dos fungos .....	31
4.8.2 Obtenção dos esporos.....	32
4.8.3 Ensaio de inibição do crescimento vegetativo .....	32
4.9 Análise estatística .....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1 Purificação da POX100 .....	35
5.2 Caracterização da POX100.....	39
5.3 Atividade de Remoção de Fenóis .....	48
5.4 Atividade Biológica.....	49
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Peroxidases (POXs) são enzimas capazes de catalisar a oxidação de  $H_2O_2$  de uma ampla variedade de substratos, sendo o grupo heme crucial para sua atividade catalítica (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Além disso, são moléculas ubíquas na natureza e relevantemente importantes para a execução de uma vasta gama de funções fisiológicas nas plantas (AL-SENAIDY; ISMAEL, 2011; KUMAR *et al.*, 2011) e em animais (ZAMOCKY, 2015). Essas enzimas podem ser agrupadas em mais de 50 subfamílias, que podem ser divididas em não-heme ou heme peroxidases (KOUA *et al.* 2009). As heme peroxidases de diversas origens estão incluídas na superfamília de peroxidases não animais, que se divide em três classes, sendo as de classe III as secretadas por plantas, como as de horseradish (HRP) (PASSARDI *et al.*, 2007). POXs de classe III, dentre as classes, são as mais abundantes em plantas (PASSARDI *et al.*, 2007) e destacam-se como as enzimas que apresentam maior potencial redox (KOTCHEY *et al.*, 2013). Um fator que faz com que as POXs atraiam intenso interesse é a sua ampla aplicabilidade na medicina, como na terapia de câncer (GUPTA, *et al.*, 2016). Além disso, POXs dessa classe apresentam elevado potencial biotecnológico na indústria e na agricultura, pois com elas é possível substituir os processos químicos convencionais que são usados em tratamentos de água e usar insumos renováveis (JULSING *et al.*, 2008).

Em comparação às tecnologias tradicionais, mecanismos utilizando tratamentos enzimáticos têm demonstrado mais vantagens e vêm sendo amplamente desenvolvidos. Pois, primeiramente, enzimas são catalisadores moleculares bastante seletivos e eficazes na remoção de compostos específicos. A solubilidade é outro ponto favorável às peroxidases, que têm se mostrado bastante solúveis em águas contaminadas (AITKEN, 1993; WILBERG *et al.*, 2002; HUSAIN, 2009; STEEVENSZ *et al.*, 2014). Além disso, estas enzimas são muito raramente inibidas por substâncias tóxicas presentes nas águas contaminadas que debilitam a vida dos organismos que habitam ambientes lacustres (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009).

Outras aplicações incluem o tratamento de efluentes oleosos (GHOLAMI-BORUJENI; NEJATZADEH-BARANDOZI; MAHVI, 2015; SHEKOOHIYAN; MOUSSAVI; NADDAFI, 2016), a remoção de peróxidos de alimentos (AGOSTINI *et al.*, 2002; HAMID, 2011), a síntese de compostos orgânicos e polímeros (OGUCHI *et*

*al.*, 1999; HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009) e o tratamento de corantes e descolorização de pigmentos de jeans (SI; CUI, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

No entanto, o uso de peroxidases ainda é bastante limitado devido à pequena gama dessas biomoléculas caracterizadas e estudadas. Portanto, o estudo das propriedades físico-químicas, atividade biológica e aplicações no contexto ambiental é de relevante interesse, pois pode propiciar ampla utilização destas enzimas em mais segmentos da biotecnologia. Assim, o conhecimento de novas peroxidases e de suas diferentes isoformas é de fundamental importância não só para entender seu papel fisiológico como, também, diversificar a gama de novas moléculas para fins biotecnológicos.

O Feijão-de-corda ou Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das leguminosa mais importantes no mundo, que está localizada principalmente em áreas tropicais e subtropicais. É uma planta adaptada a temperaturas elevadas (isto é, 20-35 °C) e a seca, em comparação com outras espécies agrícolas. Caupi é uma importante fonte de proteína na dieta de seres humanos e de animais (SEGURA-CAMPOS *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2002; HALL, 2004).

Neste trabalho, foi estabelecido o protocolo de purificação de uma peroxidase oriunda das raízes do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seguida de sua caracterização bioquímica, bem como avaliação de sua eficácia na remoção de dois tipos de fenóis. Também, foi analisado o efeito *in vitro* da POX100 contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* e, estudos fisiológicos da resposta de peroxidases nas folhas e raízes de feijão-de-corda, contra os mesmos fitopatógenos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

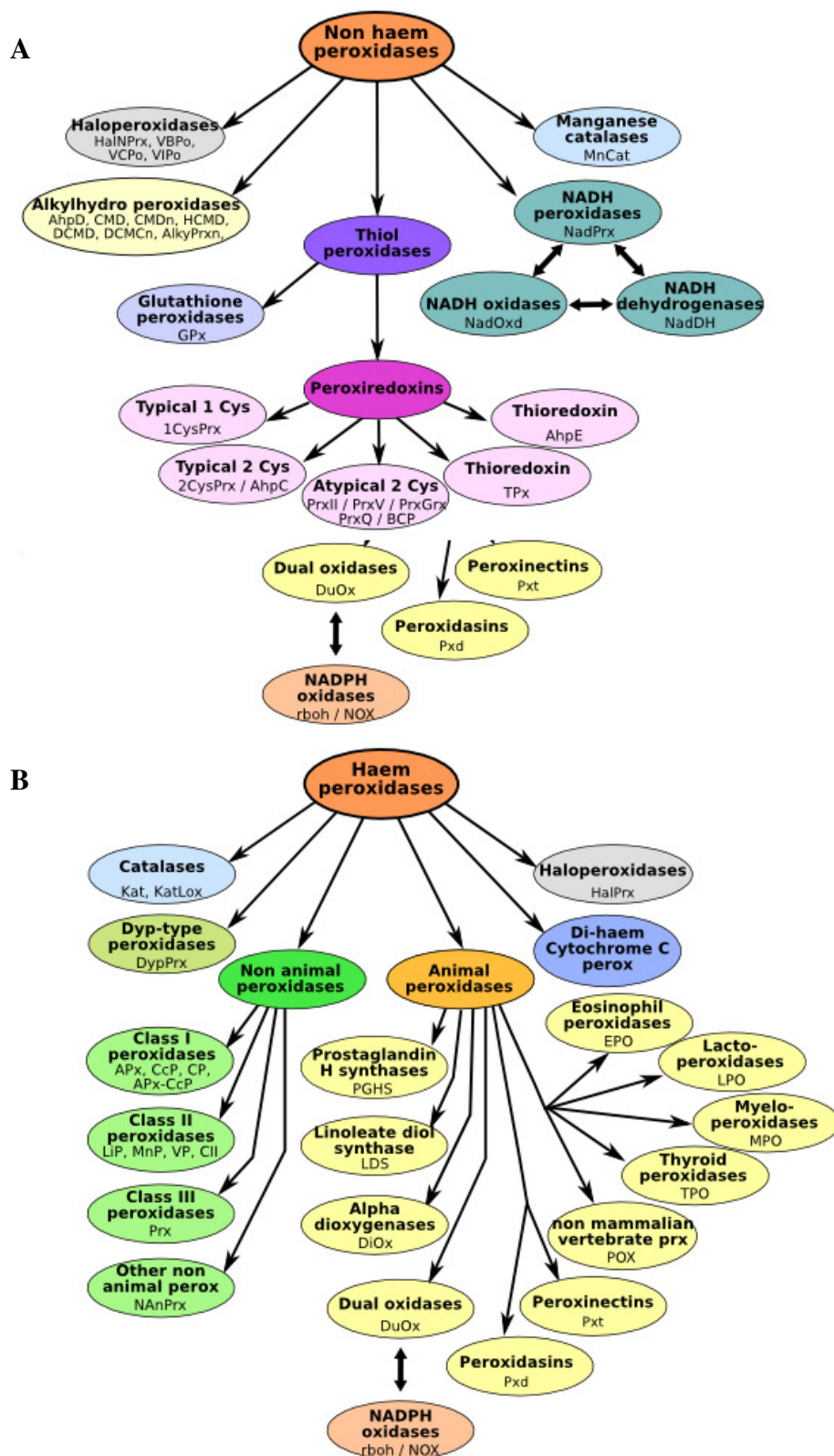
### 2.1 Heme Peroxidases

As peroxidases são proteínas formadas principalmente por  $\alpha$ -hélices, sendo divididas em não-heme ou heme peroxidases, constituindo, juntas, mais de 50 subfamílias (Figura 1) (KOUBA *et al.* 2009; BANCI *et al.*, 1997).

Heme peroxidases correspondem a enzimas constituintes de um átomo de ferro de nomenclatura ferriprotopofirina IX (grupo heme) em estado de oxidação  $3^+$ , localizado no interior de uma bolsa hidrofóbica (BANCI *et al.*, 1997; MAGARIO *et al.*, 2012). Análise realizada no PeroxiBase (<http://peroxidase.isb-sib.ch>, consulta em Janeiro de 2010) revelou que, das sequências de peroxidases conhecidas, mais de 73% correspondiam a heme peroxidases (ZAMOCKY; OBINGER, 2010).

Heme peroxidases estão presentes em todos os reinos de seres vivos existentes e participam de uma gama de processos biológicos, por exemplo, resposta imune, detoxificação, mecanismo de defesa, patogenicidade ou degradação de biomassa (LINDE *et al.* 2014).

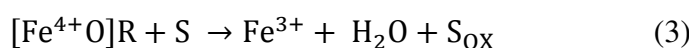
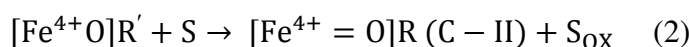
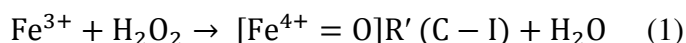
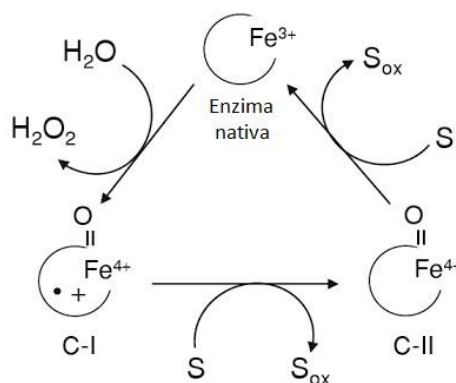
Figura 1 – Esquema representativo de duas árvores filogenéticas de peroxidases.



Fonte: Koua *et al.* 2009. Grupos e subfamílias de não-heme peroxidases (A) e heme peroxidases (B).

Segundo Zámocký *et al.* (2015), as heme peroxidases podem ser divididas em 4 superfamílias que evoluíram independentemente uma das outras (peroxidase-ciclooxigenase, peroxidase-peroxigenase, peroxidase-clorite dismutase e peroxidase-catalase), apresentando, também, diferenças quanto às suas atividades enzimáticas e quanto a estrutura (dobramento, e arquitetura do sítio ativo). Uma característica intrínseca dessas enzimas é sua capacidade de utilizar o grupo heme como um cofator redox, que age como sítio ativo da enzima, reagindo com peróxido de hidrogênio para catalizar a oxidação de uma numerosa variedade de substratos (Figura 2), podendo, estes últimos, serem doadores de um ou dois elétrons (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Doadores de um elétron abrangem desde cátions metálicos, compostos aromáticos ou alifáticos até proteínas, enquanto que doadores de dois elétrons, frequentemente, são halogenetos (como I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> ou Cl<sup>-</sup>) ou tiocianato (ZÁMOCKÝ *et al.*, 2014). Na primeira reação (1) o peróxido de hidrogênio oxida o íon Fe<sup>3+</sup> presente no grupo heme da enzima, formando um intermediário instável chamado Composto I (C-I), causando a redução do peróxido em água. Então, C-I oxida o substrato (S) doador de elétron para dar origem ao composto II (C-II) (2), que é reduzido por uma segunda molécula do substrato, tendo como consequência a regeneração do íon Fe<sup>3+</sup> e, por conseguinte, da enzima a sua forma nativa (3) (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009).

Figura 2 - Ciclo catalítico das heme peroxidases.

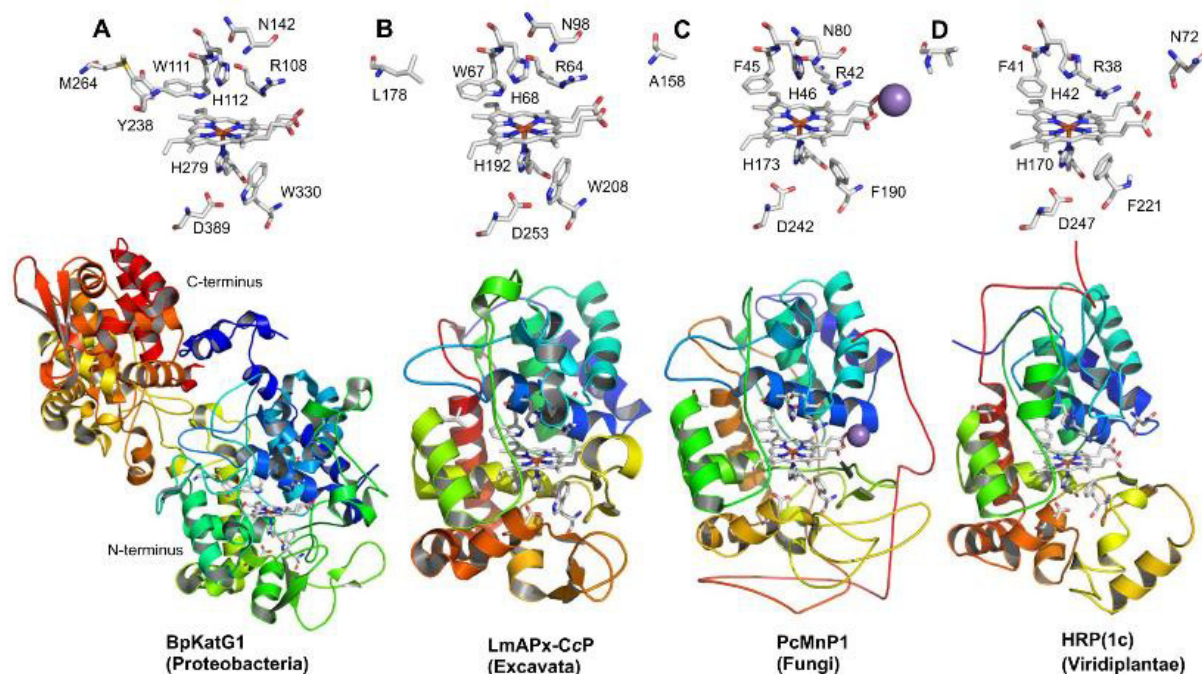


Fonte: Adaptado de Singh (2012).

### 2.1.1 Classes de heme peroxidases

A superfamília de heme peroxidases inclui peroxidases animais e não-animais, sendo a segunda geralmente dividida em três classes, todas compartilhando uma dobra tridimensional semelhante, mas, no entanto, apresentando diferentes funções e origens (WELINDER *et al.*, 1992; SMULEVICH *et al.*, 2006) (Figura 3). A Classe I (A e B) possui enzimas que são intracelulares, tais como as ascorbato peroxidases de plantas, as catalases bacterianas e as citocromo c peroxidases de leveduras. A Classe II (C) inclui peroxidases secretadas exclusivamente por organismos fúngicos, dentre elas, as lignina peroxidases e as peroxidases dependentes de  $Mn_2^+$ . Por fim, a Classe III (D) composta por peroxidases secretadas por plantas e algas, que possuem massas moleculares entre 28 e 60 kDa (WELINDER *et al.*, 1992; S. HIRAGA *et al.*, 2001; ZAMOCKY; OBINGER, 2010). Nas plantas, as peroxidases de Classe III podem executar diversas funções importantes, como formação de lignina e de suberina, reticulação dos componentes da parede celular, e síntese de fitoalexinas (ALMAGRO *et al.*, 2009).

Figura 3 - Estruturas tridimensionais representativas de cada uma das três classes de peroxidases não animais.



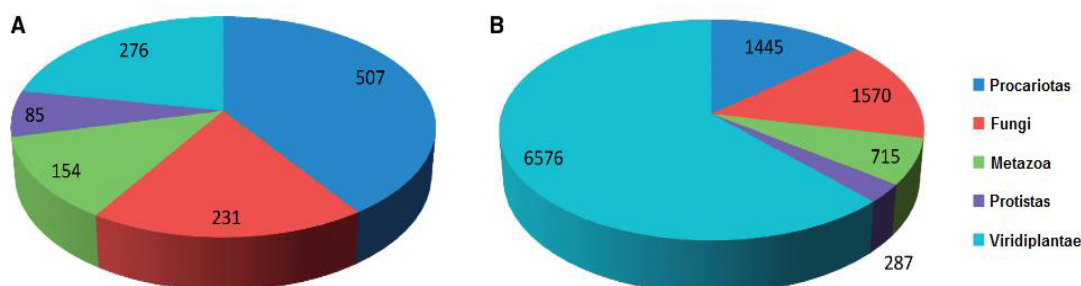
Fonte: Zámocký *et al.*, 2014. **A** e **B** correspondem a peroxidases da Classe I, **C**, Classe II e **D**, Classe III. Aonde: A. Peroxidase de *Burkholderia pseudomallei*. B. Peroxidase de *Leishmania major*. C. Manganês Peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*. D. Horseradish Peroxidase.

Mesmo com diferentes estruturas tridimensionais de um considerável número de peroxidases tendo sido determinadas, até agora, poucas são representativas da Classe III de peroxidases de plantas, como: de raíz forte (*Armoracia rusticana*) (GAJHEDE *et al.*, 1997), agrião (*Nasturtium officinale*) (ØSTERGAARD *et al.*, 2000), amendoim (*Arachis hypogaea*) (SCHULLER *et al.*, 1996), soja (*Glycine max*) (HENRIKSEN *et al.*, 2001), cevada (*Hordeum vulgare*) (HENRIKSEN; WELINDER; GAJHEDE, 1997) e palmeira real (*Archontophoenix cunninghamiana*) (WATANABE *et al.*, 2010). Esta constatação sugere a necessidade de estudos mais aprofundados em relação às peroxidases vegetais.

### 2.1.2 Peroxidases Vegetais

Peroxidases são proteínas essenciais presentes em todas as plantas vasculares, além de estarem entre as enzimas mais estudadas do mundo (KALSOON *et al.*, 2015; DUBROVSKAYA *et al.*, 2017). Uma pesquisa realizada por Fawal *et al.* (Novembro de 2013) depositada no PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), banco de dados especializado em peroxidases, revelou que apesar de não possuírem o maior número de organismos registrados (Figura 4A), as plantas verdes (viridiplantae) compõem o clado com a maior quantidade de peroxidases até, então, sequenciadas (Figura 4B).

Figura 4 - Representação de todos os reinos de seres vivos no PeroxiBase.



Fonte: Adaptado de Fawal *et al.* (2012). **A.** Número de organismos no PeroxiBase dentro dos 5 reinos. **B.** Número de sequências cadastradas no PeroxiBase dentro dos 5 reinos.

Esse aspecto se deve ao fato de plantas corresponderem aos organismos que detêm maior número de peroxidases, em comparação com os demais (Fawal *et al.* 2012). Por exemplo, Koua *et al.* (2009) indicaram que enquanto humanos possuem um pouco mais de 30 peroxidases, uma flor nativa da Europa e da Ásia da espécie *Arabidopsis thaliana*, possui em torno de 130, equivalentes a 13 diferentes famílias e 9 subfamílias.



A presença desse grande número de isoenzimas em conjunto com a versatilidade catalítica permitem o envolvimento destas proteínas em uma ampla gama de processos fisiológicos importantes, como a homeostase redox (regulam o teor de espécies reativas de oxigênio formadas em decorrência de estresses abióticos e bióticos) (BAKALOVIC *et al.* 2006; LÜTHJE *et al.*, 2011; KALSOON *et al.*, 2015). Também, estão envolvidas na síntese de componentes estruturais como suberina e lignina, na ligação cruzada de componentes da parede celular (MARJAMAA *et al.*, 2009; DEMONT-CAULET *et al.*, 2010; FUJII *et al.*, 2013; PANDEY; DWIVEDI, 2015), na defesa contra patógenos (ZIPOR; OREN-SHAMIR, 2013), na elongação celular (LISZKAY *et al.*, 2004; MANU *et al.*, 2009; HAMID *et al.*, 2009), e na detoxificação de metais pesados (PANDEY; DWIVEDI, 2011).

### **2.1.3 Peroxidases na indústria**

Em associação com tecnologias tradicionais empregadas pelas indústrias, mecanismos utilizando tratamentos enzimáticos têm demonstrado mais vantagens do que estes e vêm sendo largamente desenvolvidos. Em concordância com esta constatação, ao ser revelada a possibilidade da aplicação enzimática para a fabricação de químicos e derivados, imediatamente, passou-se a utilizar peroxidases na síntese de polímeros e compostos orgânicos na indústria (OGUCHI *et al.*, 1999). Na têxtil, é possível a utilização destas enzimas na descolorização de pigmentos de jeans e no tratamento de corantes (DE SOUZA *et al.*, 2007). Outras aplicações propõem melhor eficácia no processo de remoção de peróxidos de alimentos e de contaminantes fenólicos de águas industriais (AGOSTINI *et al.*, 2002). A solubilidade é outro ponto favorável às peroxidases, visto que estas se mostram muito solúveis em águas contaminadas (AITKEN, 1993; WILBERG *et al.* 2002; HUSAIN, 2009; STEEVENSZ *et al.*, 2014), além de serem muito dificilmente inibidas por substâncias tóxicas presentes (HAMID; KHALIL-UR-REHMAN, 2009). Na medicina, é utilizada em quites clínicos, para várias aplicações analíticas, como quantificação de glucose, colesterol, ácido úrico e lactose, além de ter forte aplicabilidade em ensaios enzimáticos de imunoabsorção (ELISA) (FATIMA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2013; KOTB, 2015).

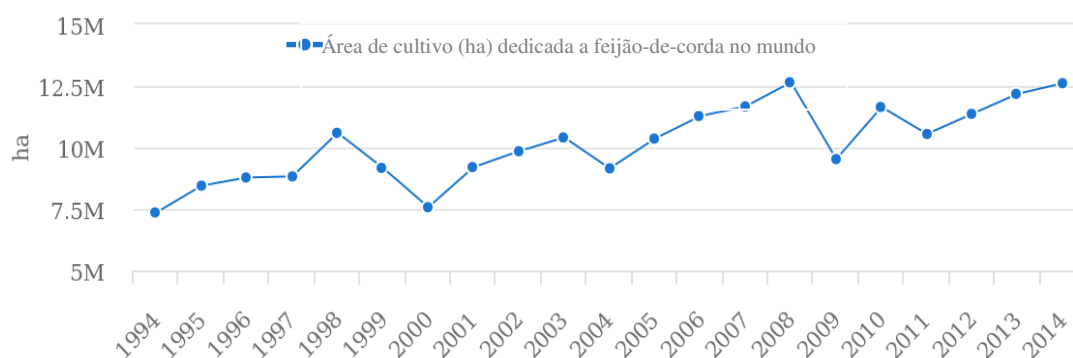
Peroxidases vegetais são uma das enzimas estudadas no contexto comercial, na atualidade, pois vêm sendo amplamente exploradas no contexto comercial por serem catalizadores moleculares bastante seletivos, portanto, eficazes na remoção de

compostos específicos (FATIMA *et al.*, 2007; DUBROVSKAYA *et al.*, 2017). A busca de enzimas para fins industriais também é favorecida devido à possibilidade destas serem produzidas em grande escala, através de diversas ferramentas da biologia molecular (ZÁMOCKÝ; OBINGER, 2010). Entretanto, a maioria das aplicações práticas de enzimas naturais é limitada por técnicas de preparação, condições de reação e requisitos de armazenamento (BRESLOW, 1995; SHOJI; FREUND, 2001), o que impulsiona uma maior demanda de estudos a fim de que seja possível se driblar tais restrições (KOTOV, 2010). Assim, as peroxidases são enzimas de utilização ainda bastante limitada devido à pequena gama dessas biomoléculas caracterizadas e estudadas. Portanto, o estudo das propriedades físico-químicas, atividade biológica e aplicações no contexto ambiental é de relevante interesse, pois pode propiciar ampla utilização destas enzimas em mais segmentos da biotecnologia. Dessa forma, o conhecimento de novas peroxidases e de suas diferentes isoformas é de fundamental importância não só para entender seu papel fisiológico como, também, diversificar a gama de novas moléculas para fins industriais, médicos e biotecnológicos.

## 2.2 Feijão-de-corda

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], também conhecido como feijão-caupi, é uma leguminosa granular indígena anual originária da África tropical (PADULOSI; NG, 1997; FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). É uma planta adaptada a altas temperaturas (i.e. 20-35 °C) e à seca, comparada a outras espécies agrícolas (HALL *et al.*, 2002, 2004). Além disso, é um importante alimento básico e, durante a estação de seca, uma fonte nutritiva crucial dentro da pecuária em muitos países, devido ao seu alto valor nutricional (CHEN *et al.*, 2017). É a leguminosa de grão seco mais importante na África subsaariana e em muitas outras partes do mundo (BADIANE *et al.*, 2012), além de ser amplamente cultivada, também, no Sudoeste da América do Norte, no Sudeste Asiático e na América Latina (BOUKAR *et al.*, 2013). Estimativas apontam que, no mundo, em 10 anos (1994-2014) a área dedicada à produção de feijão-de-corda tenha aumentado cerca de 5,5 milhões de hectares (FAO, 2015).

Figura 5 - Estimativa da área cultivada com feijão-caupi no mundo, de 1994 a 2014



Fonte: Adaptado de FAO (2015).

Segundo dados da Embrapa Arroz e Feijão (2015), no Brasil, o feijão-de-corda está presente principalmente nas regiões Norte e Nordeste (Tabela 1). No entanto, é visível que Mato Grosso (único representante da região Centro-Oeste) obtém produção muito superior aos demais estados, mesmo não possuindo maior área colhida. Damasceno *et al.* (2016) destaca que sua grande produtividade é resultado direto do emprego de tecnologias adequadas no sistema de produção da cultura, havendo baixa aplicação na região Nordeste, por exemplo

Tabela 1 - Área, produção e produtividade de feijão-de-corda por região brasileira em 2015

Estados	Área (ha)	Produção (ton)	Produtividade
<b>Norte</b>			
PA	39.169	26.442	675
AM	5.295	5.560	1050
RR	3.000	2.001	667
AP	1.180	1.108	939
<b>Total</b>	<b>48.644</b>	<b>35.111</b>	<b>3.331</b>
<b>Nordeste</b>			
CE	398.002	107.291	270
PI	214.224	55.278	258
PE	180.338	52.406	291
MA	98.152	50.314	513
BA	46.200	20.890	452
PB	5.295	17.604	273
RN	25.420	10.407	409
AL	8.960	5.364	599
SE	2.000	1.000	500
<b>Total</b>	<b>1.037.847</b>	<b>320.554</b>	<b>3.565</b>
<b>Centro-Oeste</b>			
<b>MT (Total)</b>	<b>116.000</b>	<b>127.000</b>	<b>1.095</b>

Fonte: Adaptado de Damasceno *et al.* (2016).

Uma vasta diversidade de micronutrientes é encontrada em folhas do feijão-de-corda (cálcio, cobre, ferro, fósforo, manganês, magnésio, potássio, selênio, sódio e zinco), sendo de grande importância na dieta humana e animal (WAWIRE, 2012; SINGH, 2007). Outra parte muito nutritiva do feijão-de-corda é o caule, que pode conter de 15 a 17% de proteínas, além de que é bastante digestível e largamente utilizado como forragem na pecuária (SINGH, 2007; TARAWALI *et al.*, 1997a, 1997b). Também, sua semente demonstrou possuir uma variação de 15 a 38,5% no conteúdo proteico, em estudo conduzido por Afiukwa (2013). Além disso, porta grande quantidade de minerais e fibras, por esse motivo sendo então apreciada como suplemento nutritivo, além de poder prevenir doenças crônicas (STEEL, 1985; KENDALL *et al.*, 2010; FROTA *et al.*, 2008).

### 2.3 Fungos fitopatogênicos

Apesar do Feijão-de-corda ser uma leguminosa bem adaptada sob o ponto de vista climático, há diversos problemas que prejudicam o cultivo racional desta cultura. Estas mesmas dificuldades afetam a qualidade dos grãos produzidos e o volume da

produção. Neste aspecto, as doenças causadas por agentes patogênicos (vírus, bactérias e fungos) e a herbivoria (insetos e nematóides) se destacam, sendo os fungos e vírus os mais danosos à cultura do feijão-de-corda, embora danos significativos possam ser causados por bactérias e nematóides (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2000).

Na natureza, existe grande quantidade de fungos fitopatogênicos. No entanto, devido à maior parte desses fungos terem baixo impacto econômico, estes ficam muitas vezes em posição secundária no ponto de vista do número de pesquisas centradas no controle das doenças causadas pelos mesmos. Dentre as doenças de grandes impactos econômicos causadas por fungos, a antracnose, ocasionada por fungos do gênero *Colletotrichum* se destaca, sendo o *C. gloeosporioides* a espécie mais agressiva e frequente em plantas distintas taxonomicamente, (LÓPEZ, 2001), e a murcha do fusário, causada pela espécie *Fusarium oxysporum* (RAVA *et al.*, 1996).

Visto que peroxidases (POXs) são PR-proteínas (do inglês, *Pathogenesis-Related Proteins*) que desempenham importantes funções na defesa vegetal contra patógenos (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010), é de suma importância compreender a atuação destas na defesa vegetal contra patógenos, de modo que esse conhecimento possa ser usado em futuras aplicações biotecnológicas, como no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a patógenos e, portanto, mais produtivas.

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Geral

Purificar e realizar caracterização de parâmetros bioquímicos de uma peroxidase presente em raízes de feijão-de-corda e prospectar seu potencial na remoção de fenóis e na atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*.

### 2.4.2. Específicos

- Estabelecer novo protocolo para purificação de uma nova isoforma de peroxidase;
- Determinar alguns parâmetros bioquímicos da isoforma de peroxidase purificada quanto a termoestabilidade, pH e temperatura ótimos, efeito de sais (NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, MnCl, CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub>) e aditivos (Azida de Sódio, Bissulfito de Sódio, DTT e EDTA), ponto isoelétrico (pI), presença de carboidratos ligados à enzima, cinética enzimática ( $V_{max}$ ;  $K_m$  etc.) quanto à especificidade aos substratos peróxido de hidrogênio e guaiacol, bem como caracterização dos espectros de massas;
- Analisar sua capacidade de remover os fenóis guaiacol e fenol, em escala laboratorial, visando futuras aplicações biotecnológicas na agricultura e na indústria;
- Avaliar o potencial antifúngico da peroxidase purificada, contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, por meio de ensaio de inibição do crescimento vegetativo.

### **3 HIPÓTESE E PERGUNTA BIOLÓGICA**

Diante das considerações feitas e com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foi formulada a seguinte hipótese: “Raízes de feijão-de-corda constituem uma fonte de proteínas de defesa vegetal, dentre estas, isoformas de peroxidases que podem ser purificadas e indicadas para o uso no controle do desenvolvimento vegetativo de fungos fitopatogênicos e na remoção de fenóis”.

Com base na hipótese, a seguinte pergunta biológica foi formulada:

- Dentre a miríade de proteínas presentes nas raízes de feijão-de-corda, é possível estabelecer protocolo de purificação de uma nova peroxidases com capacidade de remoção de fenóis e atividade inibitória do crescimento de fungos?

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

Ácido acético, acrilamida, 4-aminoantipirina, 3-amino-9-etilcarbazole, cloreto de amônio, sulfato de amônio, ácido ascórbico, bis-acrilamida, cloreto de cálcio, catalase, ditioneitol (DTT), 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), fetuína, guaiacol, glicina, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, cloreto de magnésio, cloreto de manganês, acetato de sódio, reagente de Schiff, cloreto de sódio, dodecilsulfato de sódio (SDS), hipoclorito de sódio, ácido periódico, polivinilpolipirrolidona (PVPP), ferricianeto de potássio, metabissulfito de potássio, inibidor de tripsina da soja (SBTI), Tris (hidroximetil) aminometano e quitina foram adquiridos da Sigma, St. Louis, EUA. As fitas com Gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) e tampão IPG, ambos na faixa de pH de 3-10, e Resource-Q, foram adquiridos da GE Healthcare, NJ, EUA. Triton X-100 da Amresco, Solon, Ohio, EUA. Todos os outros produtos químicos de grau analítico foram comprados de diversas empresas.

### 4.2 Material biológico

#### 4.2.1 Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

As sementes de feijão-de-corda, genótipo TE-97 411-1F, foram obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Meio Norte, Teresina - PI.

#### 4.2.2 Fungos fitopatogênicos

Os fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*, usados nos ensaios de inibição do crescimento vegetativo, foram obtidos na micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.



### 4.3 Germinação das sementes e manutenção das plantas

As sementes de feijão-de-corda foram higienizadas durante 5 min com hipoclorito de sódio (1%, v/v) e, em seguida, lavadas com água destilada em 5 ciclos de 2 min cada. Após lavagem, as sementes foram embebidas em água destilada por 20 min e, posteriormente, submetidas a outro ciclo de lavagens com água destilada igual ao procedimento descrito acima. Em seguida, estas sementes foram germinadas em papel germitest® (GERMILAB-A3034-8, 28 x 38 cm, pH neutro, Brasil) previamente esterilizado por autoclavagem ( $1,5 \times 10^5$  Pascal a 121 °C), duas vezes, por 30 minutos. Posteriormente, as sementes (50 por papel) foram dispostas em 5 fileiras paralelas contendo 10 sementes cada, com espaçamento de 1,5 cm entre as sementes e umedecidas com um volume de água destilada correspondente ao dobro do seu peso seco. Após 3 dias, as plântulas foram colocadas em vasos plásticos de 1,5 L (3 por vaso) contendo como substrato areia de rio, previamente lavada 7 vezes em água corrente, secas e, em seguida, esterilizada em autoclave nas condições de  $1,5 \times 10^5$  pascal a 121 °C, durante 30 minutos. As plantas foram mantidas em condições de estufa com a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) variando de 300-650  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (sensor Quantum 190SA, LI-COR, EUA), fotoperíodo de cerca de 12 h (claro/escuro) e temperaturas de  $27,0 \pm 0,8$  °C (noite) e  $31,0 \pm 3,0$  °C (dia) com  $79,8 \pm 10,9\%$  de umidade relativa. A rega foi feita com água destilada até o 2º dia após o plantio. A partir do 3º dia, as plantas foram regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por SILVEIRA *et al.* (2001), aplicada em diluições preestabelecidas no 3º e 4º dia (10 x diluída), 5º dia (5 x diluída), 6º dia (2 x diluída) e a partir do 7º dia em diante aplicada na concentração normal (1 x), com volume fixo de 100 mL por vaso.

### 4.4 Coleta do material vegetal e preparação do extrato proteico total

No 15º dia, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes destacadas do restante da planta, lavadas com água destilada e adicionadas em sacos plásticos e acondicionadas em freezer a -20 °C (BARRETO *et al.*, 2005). O extrato proteico foi obtido pela maceração das raízes em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino seguida da adição de tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M, ácido ascórbico 0,03 M, EDTA 0,003 M e 1% de PVPP) na proporção de 1:2 (m/v). As proteínas foram solubilizadas por maceração durante 20 min com o auxílio de cadinho sobre banho de gelo e pistilo. Após esse tempo, o macerado foi filtrado em pano de

trama fina e o obtido centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado (4 trocas) em membranas de celulosa com *cut off* de 12,4 kDa (Sigma-Aldrich Co., USA) contra 4 L de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M. O obtido, denominado extrato total (ET) foi estocado em freezer a -20 °C para análises posteriores.

#### **4.5 Purificação da peroxidase de raízes de *V. unguiculata***

##### **4.5.1 Precipitação por sulfato de amônio**

O ET foi submetido a precipitação com sulfato de amônio com 0-90% de saturação. O sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao ET e após a total solubilização deste, a suspensão foi mantida sob agitação lenta, por 30 min, sendo deixada em repouso, durante a noite (cerca de 12 horas), Em seguida, as proteínas precipitadas foram recuperadas por centrifugação a 18.000 x g por 20 min, 4 °C, e o precipitado ressuspendido e dialisado (3 x) contra 4 L de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,15 M. A fração proteica 0-90% obtida foi cromatografada em matriz de afinidade de quitina.

##### **4.5.2 Cromatografia de afinidade a quitina**

A matriz cromatográfica de quitina, oriunda de carapaça de caranguejo (Sigma-Aldrich Co., USA), foi preparada por sucessivas lavagens, sob agitação, com NaOH 0,1 M e HCl 0,1 M, 5 min cada, intercaladas por lavagens de 5 min com água destilada. A quitina ativada (50 mL) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl. A fração 0-90% (10 mg) foi aplicada à coluna, as proteínas não retidas (Q1) foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio, a fração retida na matriz foi eluída com solução 0,1 M de HCl (Q2).

##### **4.5.3 Cromatografia de troca iônica**

A fração não retida na cromatografia de afinidade foi dialisada contra 4 L de água ultrapura (2 trocas), liofilizada e, posteriormente, solubilizada em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e centrifugada a 12.000 x g por 10 min, 4 °C. O Q1 (2 mg) foi aplicado na coluna de troca aniônica (Resource<sup>TM</sup> Q), acoplada a um sistema de

cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC Pharmacia® LKB), sendo, previamente, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Para eluição das proteínas não retidas (RQ1), a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio. As proteínas retidas na matriz foram eluídas com concentrações crescentes de NaCl (0,050; 0,1 e 1 M) adicionados ao tampão de equilíbrio. A cromatografia foi realizada em fluxo constante de 60 mL/h com frações de 2 mL coletadas por tubo.

## **4.6 Caracterização bioquímica da peroxidase**

### ***4.6.1 Dosagem de proteínas solúveis totais***

A dosagem de proteínas solúveis totais foi feita segundo metodologia descrita por Bradford (1976). A uma alíquota de 0,1 mL das frações proteicas obtidas, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi deixada em repouso por 10 min seguido pelas leituras de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, EUA). Usando o fator de correção de uma curva pré-estabelecida com valores de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), a quantidade de proteínas solúveis existente nas amostras foi determinada. Os processos cromatográficos foram monitorados pelas leituras das absorbâncias no comprimento de onda de 280 nm, por espectrofotometria.

### ***4.6.2 Determinação da atividade peroxidásica***

A atividade peroxidásica foi determinada, segundo a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991), tendo como parâmetro de medição, a formação do composto orgânico 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona, pela ação da enzima sobre os dois substratos: peróxido de hidrogênio, como receptor de prótons e guaiacol, como doador de prótons. Para a determinação da atividade, as misturas reacionais consistiram de 990 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 500 µL de guaiacol 0,02 M e 500 µL de peróxido de hidrogênio 0,06 M. A mistura foi incubada em banho-maria a 30 °C, por 15 min e, em seguida, 10 µL de amostra foram adicionados, perfazendo um volume total de 2 mL. As absorbâncias foram lidas a 480 nm durante 3 min, em intervalos de 30 segundos. A leitura de absorbância após 10 segundos de reação foi usada como absorbância da prova em branco. Para o cálculo de atividade, foi admitido que uma unidade de atividade peroxidásica seja igual a uma unidade de absorbância por mL/min.

#### **4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A pureza das frações proteicas obtidas, e que exibiram atividade peroxidásica, foi verificada por eletroforese desnaturante, não-redutora e redutora, em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), adaptado para ser desenvolvida num sistema mini vertical (*Hoefer® miniVE Vertical Electrophoresis System*, Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco CA, EUA), à temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C). As amostras foram preparadas por diluição (1:3, v/v) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 1% [m/v] de SDS e 0,1% [m/v] de azul de bromofenol) na presença ou ausência de ditioneitol (DTT) a 3,8% (m/v), sendo fervidas a 98 °C, por 5 min e imediatamente resfriada em banho de gelo por 5 minutos. Após centrifugação ( $12\ 000 \times g$ , 5 min, 4 °C), as amostras foram aplicadas no gel (10 x 10,5 cm) de poliacrilamida (empilhamento, 3,5% [m/v]; separação, 12,5% ou 15% [m/v]) e a corrida realizada aplicando uma corrente de 20 mA por gel. A massa molecular da peroxidase purificada (POX100) foi determinada por comparação com padrões de proteínas de massa molecular conhecida (GE Healthcare Life Science, USA), vendidos comercialmente (fosforilase b, 97,0 kDa; albumina de soro bovino, 66,0 kDa; ovalbumina, 45,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina de soja, 20,1 kDa; e  $\alpha$ -lactalbumina kDa, 14,4 kDa) com a utilização do *software E-capt version 12.7 for Windows 2004-2005* (Viber Lourmat, Deutschland).

#### **4.6.4 Revelação por nitrato de prata**

As bandas foram reveladas com nitrato de prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987). Inicialmente, o gel foi deixado em contato por 2 h, à temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C), com solução fixadora composta por etanol a 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água grau Milli-Q. Passado o período de incubação, o gel foi desidratado com etanol 30% (v/v), em 2 ciclos de 20 min cada e, ao final, uma lavagem de 20 min com água grau Milli-Q. Em seguida, solução sensibilizadora de tiosulfato de sódio 0,1 N foi adicionada e mantida por 1 min sob agitação branda. Decorrido esse tempo, 3 lavagens de 20 segundos, cada, com água grau Milli-Q foram feitas, sendo, então, adicionada a solução de nitrato de prata (125 mg de  $\text{AgNO}_3$  e 18,75  $\mu\text{L}$  de formaldeído [37%, v/v] em 62,5 mL de água grau Milli-Q), e a incubação mantida sob agitação branda por 20 min na ausência de luminosidade. Após esse tempo, o gel foi submetido a 3 lavagens de

20 segundos cada com água grau Milli-Q e, em seguida, incubado com a solução reveladora (1,875 g de carbonato de cálcio, 31,75 µL de formaldeído [37%, v/v] e 1 mL da solução sensibilizadora referida acima em 62,5 mL de água grau Milli-Q) até o aparecimento das bandas proteicas. A reação de revelação foi interrompida pela adição de glicina 0,5% (m/v).

#### **4.6.5 Zimografia**

A atividade peroxidásica em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada seguindo metodologia descrita por Caruso *et al.* (1999), com algumas modificações (OLIVEIRA, 2006). Após corrida eletroforética nas condições previamente citadas (seção 4.6.3), o gel foi imerso em solução “renaturante” de Triton X-100 2,5% (v/v), por 30 min, a 25 °C e, posteriormente, imerso em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 e incubado por 30 min a 25 °C. Para revelação da atividade peroxidásica, o gel foi mergulhado em solução reveladora, composta de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 contendo guaiacol 0,2% (v/v), 3-amino-9-etil-carbazol 0,01% (m/v) e peróxido de hidrogênio 0,03% (v/v). Após revelação da atividade peroxidásica, a reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada.

#### **4.6.6 Detecção de carboidratos ligados covalentemente à POX100**

A detecção da possível presença de carboidrato covalentemente ligado na estrutura da peroxidase purificada (POX100) foi realizada por meio de SDS-PAGE, cujo gel, após corrida eletroforética, foi revelado pelo método do Ácido Periódico de Schiff (PAS, Sigma), descrito por Zacharius *et al.* (1969). O gel e as amostras (POX100, fetuína [controle positivo] e SBTI [controle negativo]) foram preparados como descrito anteriormente, bem como as condições de corrida utilizadas (seção 4.6.3). Ao término da corrida, o gel foi imerso em solução fixadora consistindo de ácido acético 7,5% (v/v) e, após 1 h, foi transferido para a solução de ácido periódico a 0,2% (v/v), na qual permaneceu por 45 min, a 4 °C. Posteriormente, o gel foi incubado com o reagente de Schiff por 45 min, a 4 °C, no escuro. Em seguida, o gel foi lavado para remover a coloração de fundo, por meio de lavagem do gel, repetidas vezes, com solução de metabissulfito de potássio 0,5% (v/v) em HCl 0,05 M.

#### **4.6.7 Determinação do ponto isoelétrico (pI) da POX100**

Na eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE), realizada com o objetivo de determinar o ponto isoelétrico da POX100 purificada, 15 µg da proteína foram solubilizadas em 250 µL de tampão de rehidratação [ureia 8 M, tiourea 1 M, glicerol 10% (v/v), CHAPS 2% (m/v), 1% (v/v) tampão IPG (pH 3-10) e azul de bromofenol 0,001% (m/v)] e colocados em contato com fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm de comprimento e faixa de pH 3-10 (GE Healthcare Life Science, USA), durante 14 h. A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada em sistema Ettan™ IPGphor-II (Amersham Bioscience®) com a seguinte programação: 200 V por 1 h; 500 V por 1 h; 1000 V por 1 h e um gradiente de 4000 V até atingir 18000 V/h totais a 20 °C; e uma corrente de 50 µA. Após a IEF, as fitas foram equilibradas, sob agitação, em solução de equilíbrio e redução [Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8, contendo glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v), DTT 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v)] durante 15 min em agitação lenta. Posteriormente, essas fitas foram lavadas com uma solução de alquilação [Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8, contendo glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v), iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de bromofenol 0,1%], por 15 min, sob leve agitação orbital. Para eletroforese em segunda dimensão, a fita foi colocada no topo de um gel de poliacrilamida a 12,5% (contendo SDS, como descrito anteriormente) e a eletroforese realizada sob corrente constante de 30 mA e tensão máxima de 250 V. Este procedimento foi realizado em um sistema de eletroforese vertical (Hoefer SE 600 Ruby, Amersham Bioscience®). As proteínas foram visualizadas pela incubação do gel com azul brilhante de Commassie G-250 (CANDIANO *et al.*, 2004) e analisadas usando *scanner* (HP - resolução de 1200 x 600 dpi) e *software ImageScanner* (Amersham Bioscience®). Para a determinação do ponto isoelétrico, o gel foi analisado pelo *software* ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare Life Science, USA).

#### **4.6.8 Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal**

A sequência NH<sub>2</sub>-terminal da POX100 purificada foi determinada usando o sequenciador automático “PPSQ-23A Sequencer” da Shimadzu Co®, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), seguindo o método de degradação de Edman (EDMAN, 1950). Derivados PHT dos aminoácidos foram detectados a 269 nm,

após separação em coluna C18 (4.6 x 2.5 mm), eluída em condições isocráticas, de acordo com as instruções do fornecedor.

#### **4.6.9 Espectrometria de Massas**

O espectro de massas da POX100 foi obtido por ESI-Q-TOF MS/MS (do inglês, *Electrospray ionization-quadrupole-time of fly Mass Spectrometry*), do departamento de Farmácia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). A POX100 purificada (5 µg) foi digerida com tripsina de acordo com o protocolo de Shevchenko (1996). Os peptídeos trípticos obtidos foram secos a vácuo e diluídos em água ultrapura. Em seguida, a eles foram adicionados 10 mL de ácido fórmico em solução de injeção (acetonitrila 0,1%). Os peptídeos foram separados pela aplicação de alíquotas de 4 µL no sistema nano ACQUITY UPLC (Waters®, USA) e eluição com gradiente linear (0-80%) de acetonitrila durante 40 minutos. Os picos obtidos na coluna C2C18 de fase reversa foram ionizados e os espectros de massas analisados. Os espectros de massas foram obtidos no modo interativo, sendo a amostra analisada automaticamente no modo refletor em MS, e os picos gerados analisados por MS/MS. A análise dos resultados foi feita utilizando o programa ProteinLynx Global Server (Waters®, USA), e os dados de MS/MS foram processados e submetidos ao *software* de busca MASCOT (Matrix Science LTDA). Utilizando como modificação fixa a “carbamidometilação da cisteína” e modificação variável “oxidação da metionina”. As sequências dos peptídeos obtidas foram submetidas a buscas por sequências semelhantes no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), usando a ferramenta de busca BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Aquelas que apresentaram maior percentual de identidade foram escolhidas e alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW.

#### **4.6.10 Avaliação da temperatura ótima da atividade peroxidásica**

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da POX100, a mistura reacional descrita na seção 4.6.2 foi incubada a 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 97,5 °C em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. O ensaio foi realizado no tempo de 3 min com leituras nos tempos anteriormente descritos.

#### **4.6.11 Avaliação da termoestabilidade da POX100**

Para avaliar a estabilidade térmica da POX100, a enzima foi incubada em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 nas temperaturas de 30, 40, 60, 70, 80 e 90 °C, num intervalo de tratamento variando de 0 a 120 minutos. Após cada tempo, alíquotas de 35 µL da enzima foram retiradas e postas em banho de gelo por 3 min e em seguida a atividade foi medida em triplicatas utilizando 10 µL assim como citado na metodologia da atividade peroxidásica descrita na seção 4.6.2.

#### **4.6.12 Avaliação do pH ótimo da atividade peroxidásica**

Para avaliar o pH ótimo da POX100, o ensaio da atividade peroxidásica foi realizado utilizando os tampões citrato de sódio (pH 3 e 4), acetato de sódio (pH 5 e 6), fosfato de sódio (pH 7 e 8), Tris HCl (pH 9) e glicina (pH 10), todos na concentração de 0,05 M, e à temperatura de 30 °C.

#### **4.6.13 Cinética enzimática da POX100**

Para obtenção da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da POX100 em relação ao guaiacol, a concentração de  $H_2O_2$  foi fixada a 0,06 M enquanto variava a concentração de guaiacol ( $5 \times 10^{-4}$  a 0,08 M). Para calcular o  $K_m$  e  $V_{max}$  de POX100 em relação a  $H_2O_2$ , a concentração de guaiacol foi mantida a 0,02 M utilizando várias concentrações de  $H_2O_2$  ( $7,5 \times 10^{-3}$  e 0,7 M). Para ambos os ensaios, a atividade da peroxidase foi medida como descrito anteriormente (seção 4.6.2), sendo utilizados 0,0295 µg de proteína diluídos em 10 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Para a determinação dos parâmetros cinéticos citados, os dados foram linearizados pela utilização do gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

#### **4.6.14 Efeito de aditivos e sais sobre a atividade peroxidásica da POX100**

A POX100 purificada foi incubada a 30 °C com 0,01 M de diferentes aditivos e sais [EDTA, bissulfito de sódio (BS), Azida de sódio (AS), ditioneitol (DTT) NaCl,  $NH_4Cl$ ,  $MnCl$ ,  $CaCl_2$  e  $MgCl_2$ ] por 30 minutos. Para o controle, tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi utilizado. O ensaio foi realizado como descrito na seção 4.6.2, sendo utilizados 0,12 µg de proteína diluídos em 10 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.



#### 4.7 Atividade de remoção de fenóis

Todo o procedimento descrito abaixo foi baseado na metodologia desenvolvida por Lavery (2010) com ajustes. As reações foram conduzidas em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0, 40 °C. Inicialmente, a mistura reacional (1 mL) foi preparada pela adição de  $1 \times 10^{-3}$  M de guaiacol ou fenol ( $C_6H_5OH$ ) e 0,02 M de peróxido de hidrogênio para 990  $\mu$ L de tampão. Dois brancos foram utilizados: um (sem adição da amostra) para cada composto fenólico; outro para os reagentes (sem adição dos compostos fenólicos). Aliquotas de 10  $\mu$ L da amostra (0,059  $\mu$ gP/ $\mu$ L) foram adicionados à mistura reacional e incubada durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min a 40 °C. Ao final de cada tempo, 50  $\mu$ L de catalase (2000 U/mL) foram adicionados para a decomposição do  $H_2O_2$  residual e, conseqüentemente, parada da atividade da POX100. A análise da capacidade de oxidação dos compostos fenólicos foi determinada pela transferência de uma alíquota de 500  $\mu$ L da solução obtida, após a reação enzimática, para um novo tubo, seguida da adição de 500  $\mu$ L de Ferricianeto de potássio (0,083 M em 0,25 M de bicarbonato de sódio) e 500  $\mu$ L de 4-aminoantipirina (0,0208 M em 0,25 M de bicarbonato de sódio). A concentração remanescente dos compostos fenólicos foi calculada após leitura em espectrofotômetro a 505 nm. Para o cálculo da concentração residual de fenol foi utilizada a fórmula abaixo:

$$\%Fenol = \left\{ 1 - \frac{Exp}{Branco} \right\} \times 100$$

\*Exp = abs (505 nm) das amostras.

#### 4.8 Atividade biológica

##### 4.8.1 Cultivo dos fungos

O cultivo dos fungos *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum* foi realizado em 25 mL de meio batata dextrose agar (BDA), distribuídos em placas de Petri (10 cm de diâmetro), em condições estéreis, ficando mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. (Q315M, QUIMIS, Brasil) a 27 °C, umidade de aproximadamente 70% e fotoperíodo de 12 horas (escuro/claro). O meio de cultura foi preparado adicionando 39 g de BDA (HIMEDIA®), dissolvidos em 1 L de água grau Milli-Q, sendo a mistura

homogeneizada, fervida em banho-maria e, posteriormente, autoclavada por 15 min, 121 °C,  $1,5 \times 10^5$  Pa. Em capela de fluxo laminar, sob condições estéreis, círculos de cerca de 1 cm de diâmetro do meio gelificado contendo o fungo de colônias pré-existentes foram retirados e repicados para o centro de placas de Petri contendo BDA e, em seguida, fechadas e deixadas em BOD, nas condições descritas acima, para posterior obtenção dos esporos

#### **4.8.2 Obtenção dos esporos**

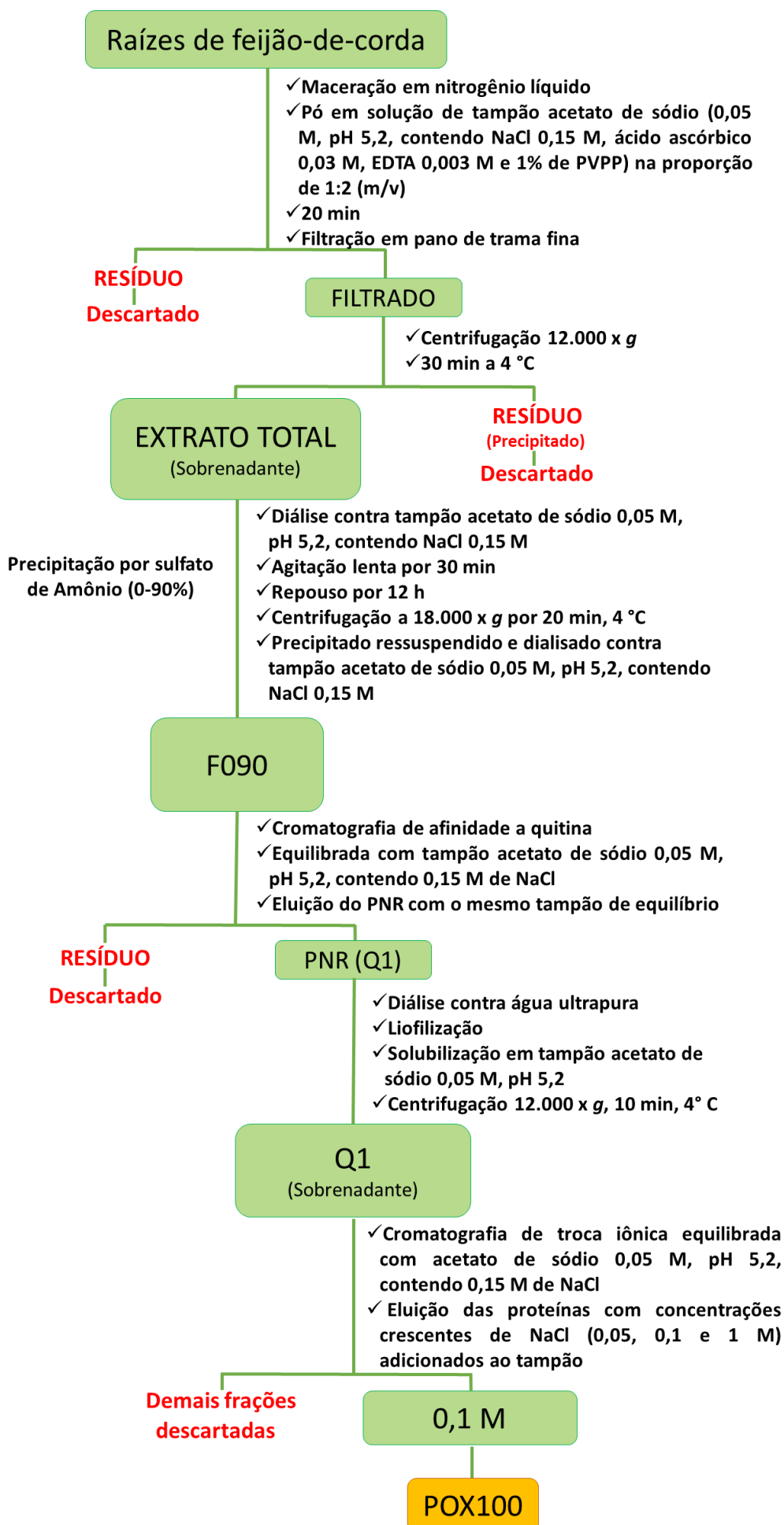
Após os fungos terem tomado todo o diâmetro da placa de Petri (aproximadamente 15 dias), estas foram abertas em câmara de fluxo laminar, 10 mL de água estéril foram adicionados sobre o micélio e, com o auxílio de uma alça de Drigalski, os esporos foram liberados, por meio de manuseio suave. As hifas remanescentes na suspensão de esporos foram removidas por filtração em 4 camadas de pano de trama fina. A concentração da suspensão de esporos resultante foi obtida com o auxílio da Câmara de Neubauer e, em seguida, ajustada para a concentração de  $2,0 \times 10^5$  células/mL. As suspensões foram acondicionadas a 4 °C até o momento de sua utilização.

#### **4.8.3 Ensaio de inibição do crescimento vegetativo**

Os ensaios de inibição do crescimento vegetativo dos fungos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Freire *et al.*, (2002), com modificações. Dez microlitros da suspensão de esporos ( $2,0 \times 10^5$  esporos/mL) dos fungos (*C. gloeosporioides* e *F. oxysporum*) foram incubados com 90 µL de meio YPD (*Yeast Potato Dextrose*) por 12 horas, 27 °C, no escuro. Passado o tempo de incubação, a POX100 (2,5 µg diluídos em 100 µL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2) previamente filtrada em filtro Millex® GV (0,22 µm), foi adicionada. As avaliações do efeito da POX100 sobre o crescimento micelial dos fungos foram monitoradas através de leituras espectrofotométricas a 630 nm, realizadas nos intervalos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após aplicação da amostra. O tampão acetado de sódio 0,05 M, pH 5,2 e peróxido de hidrogênio (0,1 M) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados, obtidos em triplicata, foram submetidos à análise de variância e significância das diferenças entre as médias determinadas pelo *software* Assistat (versão 7.7 beta) usando teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (SILVA & AZEVEDO, 2009).

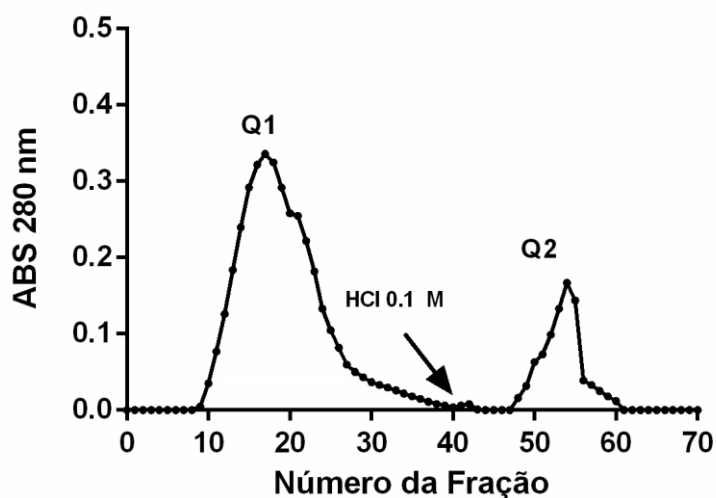


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Purificação da POX100

As proteínas solúveis totais foram obtidas a partir de 105 g de massa fresca de raízes de *V. unguiculata*, a partir dos quais, após extração, 41,26 mg de proteínas foram obtidos, sendo esta fração proteica denominada extrato total (ET). Estas proteínas contidas na fração denominada extrato total (ET). O ET foi tratado com sulfato de amônio (SA) na concentração de 90%, sendo obtida a fração proteica F090, que continha apenas 48,4% da proteína do ET (Tabela 2). Entretanto, a precipitação com SA, como passo de purificação da POX100, foi viável, uma vez que houve aumento de 2,2 vezes na atividade peroxidásica específica em relação ao ET (Tabela 2). Prosseguindo nas etapas de purificação, a F090 foi cromatografada em coluna de afinidade tendo quitina como matriz. O perfil cromatográfico resultante (Figura 6) mostrou haver proteínas que não interagem com a matriz (Q1), na qual ficou concentrada toda atividade peroxidásica. Assim, pela análise do perfil cromatográfico e atividade enzimática obtida, foi possível inferir que grande parte das isoformas de peroxidases presentes em raízes de feijão-de-corda, não possuem sítio de reconhecimento à quitina. Além disso, parece ter havido desnaturação da atividade peroxidásica, pois o índice de purificação em relação ao ET foi menor do que aquele observado para a F090 (Tabela 2).

Figura 6 - Perfil cromatográfico típico e representativo da F090 fracionada em coluna de afinidade tendo quitina como matriz

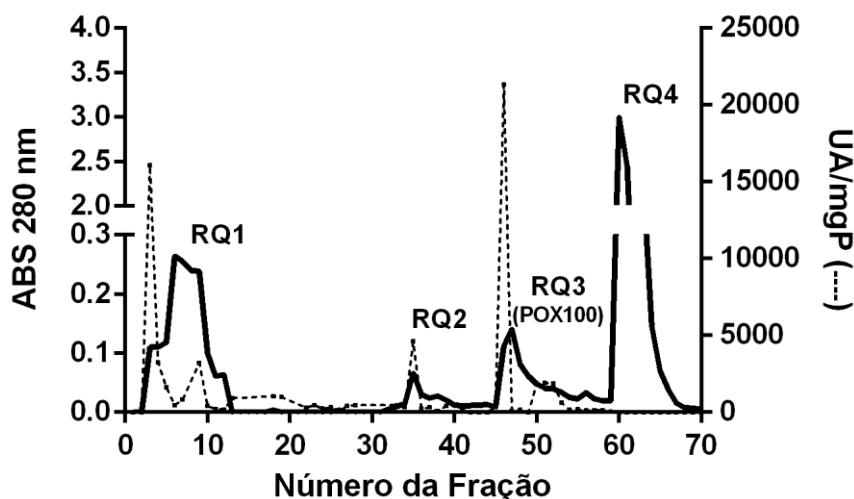


Fonte: Próprio autor. A fração proteica F090, foi aplicada (10,6 mgP/5 mL) na coluna previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2 contendo NaCl 0,15 M. Para remoção das proteínas retidas, foi utilizado solução de HCl 0,1 M. Fluxo: 1 mL/min. Volume coletado/tubo: 5 mL.

A fração não retida na matriz de quitina (Q1), foi dialisada contra água ultrapura e liofilizada. Então, foi ressuspensa em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, centrifugada e aplicada em coluna de troca aniônica (Resource™ Q). Ao término da cromatografia, 4 frações proteicas foram obtidas (Figura 7), sendo a eluída na concentração de 0,1 M de NaCl referente à peroxidase purificada (como visto por SDS-PAGE na figura 8) que foi denominada POX100. Diversos trabalhos relataram, anteriormente, o uso de cromatografia de troca iônica para a purificação de diversas peroxidases vegetais (CAI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2017; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013), demonstrando ser uma boa alternativa no processo de purificação destas biomoléculas. A POX100 apresentou a maior atividade peroxidásica específica, purificação de 3,2 vezes em relação ao ET e rendimento de 0,7% (Tabela 2). Rendimentos inferiores ao da POX100 foram observados para peroxidases de *Selaginella martensii* (MARTÍNEZ-CORTÉS *et al.*, 2012), *Persea americana* (ROJAS-REYES *et al.*, 2013), e *Marsdenia megalantha* (Oliveira *et al.*, 2017) cujos rendimentos respectivos foram de 0,2, 0,49, 0,03 respectivamente. Além disso, durante as etapas de purificação, foi possível observar que F090 apresentou atividade peroxidásica total 1,07 vezes maior que de ET. Esse mesmo padrão foi confirmado por repetições do mesmo ensaio, porém de outras raízes. A hipótese para esse resultado é a

de que durante a precipitação, foi removido algum componente inibidor antes contido no ET. Condição similar foi observada nos passos de purificação de uma peroxidase de *Raphanus sativus* (ARUNA; LALI, 2001).

Figura 7 - Perfil cromatográfico típico e representativo de Q1 fracionado em coluna de troca aniônica (Resource™ Q) acoplada a um sistema de cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC Pharmacia® LKB) e atividade peroxidásica das frações



Fonte: Próprio autor. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e 2 mg de proteína/2 mL do Q1 foram aplicados na matriz RsQ para separação das isoformas de peroxidases. A eluição das proteínas não retidas (RQ1) foi feita com o próprio tampão de equilíbrio e as proteínas retidas (RQ2, RQ3 e RQ4) pelo aumento da concentração de NaCl no tampão de equilíbrio (0,05 M, 0,1 M e 1,0 M, respectivamente) a um fluxo de 1 mL/min. Volume coletado/tubo: 2 mL.

Tabela 2 - Frações obtidas durante as etapas de purificação\*da POX100 de raízes de feijão-de-corda

<b>Frações</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Proteínas Totais (mgP)</b>	<b>Atividade Total (UA)**</b>	<b>Atividade Específica (UA/mgP)</b>	<b>Purificação (x)</b>	<b>Rendimento (%)***</b>
<b>Extrato Total</b>	315,0	41,3	38745,0	939,1	1,0	100,0
<b>F090</b>	30,0	19,9	41580,0	2084,0	2,2	48,3
<b>Q1</b>	462,9	13,9	20552,7	1480,0	1,6	33,7
<b>RQ3 (POX100)</b>	12,0	0,3	903,6	3012,0	3,2	0,7

\*Purificação a partir de 105,86 g de raízes de feijão-de-corda.

\*\*UA refere-se à uma unidade de atividade peroxidásica, tida como uma unidade de absorvância por mL/min.

\*\*\*Calculado com base na proteína recuperada.

Fonte: Próprio autor.

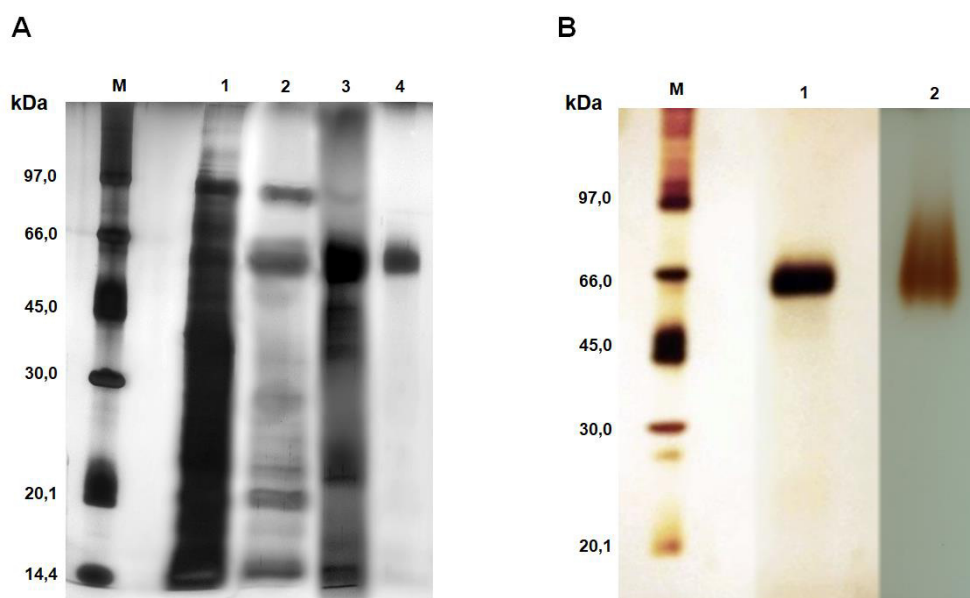


## 5.2 Caracterização da POX100

A análise por SDS-PAGE das frações proteicas referentes aos passos de purificação da POX100 (Figura 8A) mostrou a presença de diversas bandas proteicas no ET e F090, mas com progressiva diminuição destas durante o processo de purificação. E por fim, a presença de uma única banda proteica no RQ3 (Figura 8A – Raia 4), indicando que os passos de purificação foram eficientes, permitindo a obtenção da POX100 de forma homogênea. A zimografia feita em gel de poliacrilamida (12,5%, v/v) para detecção de atividade peroxidásica revelou uma única banda bem proeminente para POX100 (Figura 8B – Raia 2), indicando, provavelmente, haver apenas uma isoforma de peroxidase com forte-atividade peroxidásica.

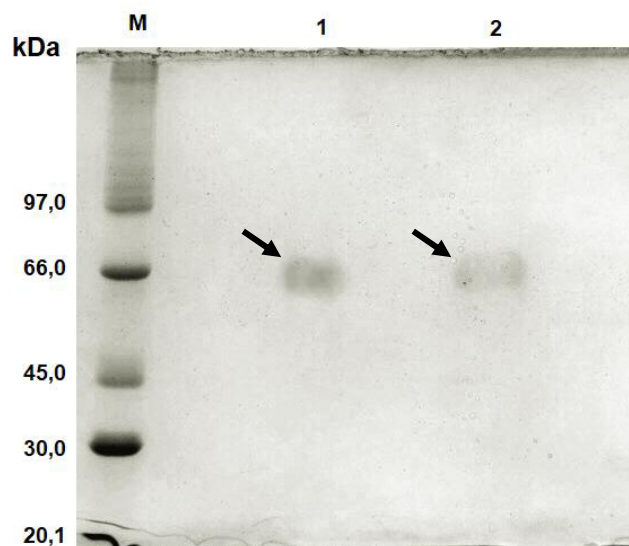
A presença do agente redutor (DTT) revelou que a POX100 é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica (Figura 9), assim como as peroxidases de *Olea europaea* L. (SARAIVA *et al.* 2007) e a peroxidase de *Moringa oleífera* L. (KHATUN *et al.*, 2012).

Figura 8 – Perfil eletroforético (SDS-PAGE, 12,5% v/v) das frações obtidas durante os passos de purificação e zimografia da POX100 de raízes de feijão-de-corda



Fonte: Próprio autor. **A.** Raia **M**: marcador de massas moleculares. Raia **1**: extrato total (ET); Raia **2**: fração precipitada com sulfato de amônio (F090); Raia **3**: fração não retida em coluna de quitina (Q1); Raia **4**: POX100 (RQ3). **B.** Raia **M**: marcador de massas moleculares. Raia **1**: revelação da POX100 com nitrato de prata; Raia **2**: zimografia.

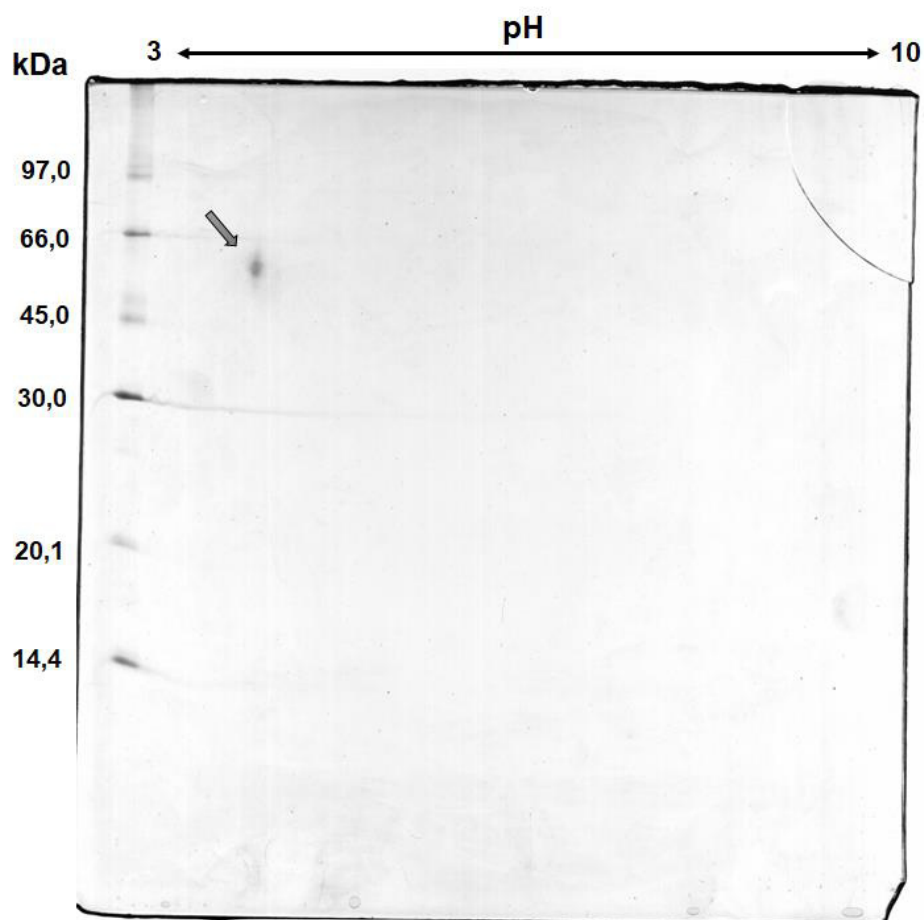
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%, v/v) da POX100 purificada na presença e ausência de agente redutor (DTT)



Fonte: Próprio autor. Raia M: Marcador de massa molecular. Raia 1: POX100 na presença de 10 mM de DTT. Raia 2: POX100 na ausência de DTT. Amostra aplicada: 1,0  $\mu$ g de proteína. Revelação por Coomassie Brilliant Blue.

Eletroforese bidimensional da POX100 revelou apenas uma mancha correspondendo à massa molecular de 58 kDa e ponto isoelétrico de 3,79 (Figura 10). Este valor de massa molecular condiz com a classificação da POX100 como peroxidase de Classe III, visto que enzimas dessa classe apresentam massa molecular entre 28 e 60 kDa (HIRAGA *et al.*, 2001). O pI ácido da enzima indica a presença de aminoácidos com baixos valores de pKa, ou seja, maior quantidade de aminoácidos ácidos. A natureza de peroxidases pode variar relativamente quanto à acidez e basicidade (HERRERO; ESTEBAN-CARRASCO; ZAPATA, 2013). Por exemplo, a peroxidase purificada de caule de brócolis (*Brassica oleracea*) possui pI = 5 (THONGSOOK *et al.*, 2007). Também há trabalhos na literatura com peroxidases básicas, a exemplo da peroxidase de folhas de cálamus (*Acorus calamus*), com pI = 7,93 (GHOSH, 2006).

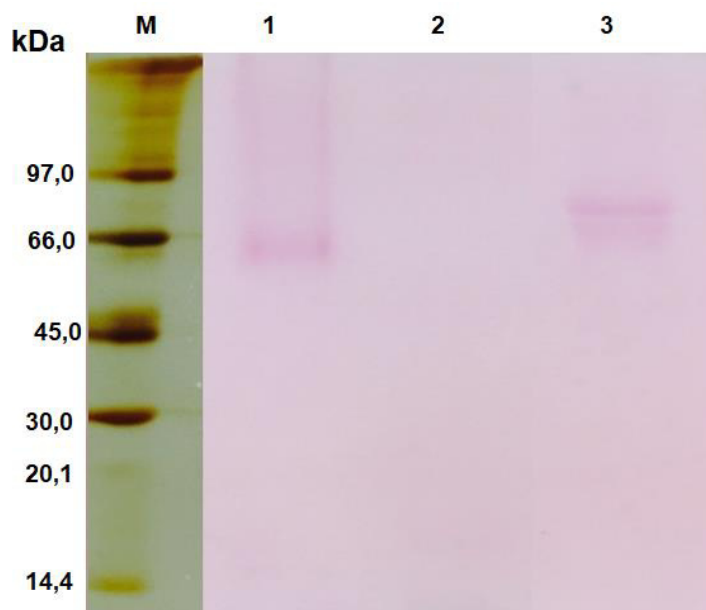
Figura 10 - Eletroforese bidimensional da POX100



Fonte: Próprio autor. Os marcadores de massa molecular estão à esquerda do gel de poliacrilamida (12,5%, v/v). A POX100 (10  $\mu$ g), indicada pela seta, foi submetida à focalização isoeletrica em fitas de gradientes de pH imobilizados em gel de poliacrilamida na faixa de 3-10.

A POX100 é uma glicoproteína, pois possui carboidrato ligado covalentemente à sua estrutura (Figura 11). Peroxidases de classe III geralmente são glicosiladas (AL-SENAIDY & ISMAEL, 2011), como verificado por Tigier *et al.* (1991) para peroxidases de sementes de pêssegos e por Mika *et al.* (2008) para peroxidases de raízes de milho.

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%, v/v) para detecção de glicoproteína pelo método do ácido periódico de Schiff



Fonte: Próprio autor. Raia **M**: marcador de massa molecular revelado por nitrato de prata; Raia **1**: POX100; Raia **2**: SBTI (controle negativo); Raia **3**: Fetuína (controle positivo). Foram aplicadas 10 µg de proteína em cada raia.

Apesar das tentativas, não foi possível a obtenção da sequência NH<sub>2</sub>-terminal da POX100, seguindo o método de degradação de Edman. Uma provável explicação é que esta enzima possui a região NH<sub>2</sub>-terminal bloqueada. Entretanto, o sequenciamento da POX100 por Espectrometria de Massas gerou 2 peptídeos (RCSTFINRL e RGLDVVNDIKT) (Tabela 3). A análise comparativa com outras proteínas depositadas em banco de dados (NCBI) mostrou que a sequência do peptídeo RCSTFINRL da POX100 possui similaridade de 100, 100 e 88% com sequências internas das enzimas peroxidase 54 de *Glycine soja*, peroxidase do tegumento da semente de *Glycine max* e precursor da peroxidase 1 de *Phaseolus vulgaris*, respectivamente. O peptídeo RGLDVVNDIKT, por sua vez, mostrou similaridade de 100, 100 e 91% com sequências internas da peroxidase 53 de *Glycine soja*, peroxidase do tegumento da semente de *Glycine max* e precursor da peroxidase 1 de *Phaseolus vulgaris*, respectivamente. A alta similaridade com sequências de tais enzimas, confirma a classificação da POX100 dentro do grupo das peroxidases vegetais de leguminosa.

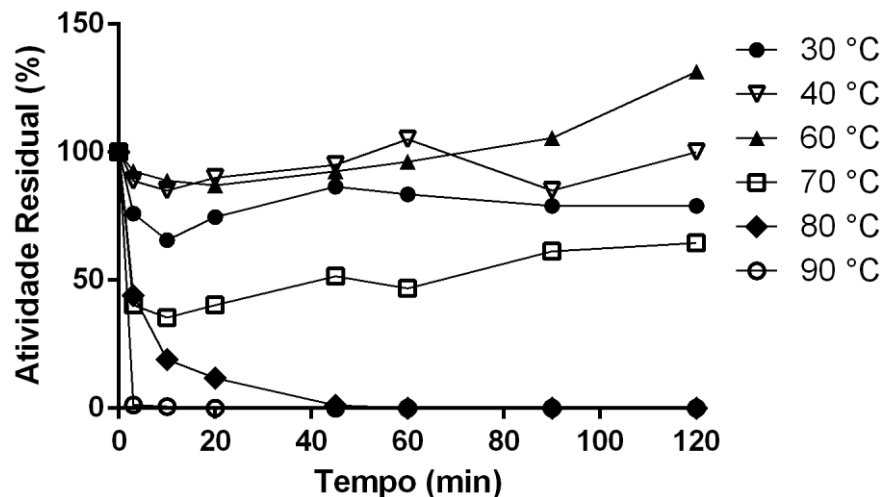
Tabela 3 – Sequências dos peptídeos 1 e 2, obtidas a partir da digestão trípica da POX100 seguida de espectrometria de massas, em comparação com sequências similares depositadas em bancos de dados

Proteína	Organismo	Sequência	Similaridade (%)	ID#
<b>POX100– Peptídeo 1</b>	<i>V. unguiculata</i>	--RCSTFINRL-- *****		
Peroxidase 54 [ <i>Glycine soja</i> ]	<i>G. soja</i>	(69) RCSTFINRL (77) *****	100	gb KHN14346.1
Seed coat peroxidase isozyme, partial [ <i>Glycine max</i> ]	<i>G. max</i>	(135) RCSTFINRL (143) *****	100	gb AAB19129.1
Peroxidase 1 precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	<i>P. vulgaris</i>	(191) CSTFINRL (198) *****	88	gb AAD37427.1 AF149277_1
Proteína	Organismo	Sequência	Similaridade (%)	ID#
<b>POX100– Peptídeo 2</b>	<i>V. unguiculata</i>	RGLDVVNDIKT *****		
Peroxidase 53 [ <i>Glycine soja</i> ]	<i>G. soja</i>	(39) RGLDVVNDIKT (49) *****	100	gb KHN22985.1
Seed coat peroxidase isozyme, partial [ <i>Glycine max</i> ]	<i>G. max</i>	(35) RGLDVVNDIKT (45) *****	100	gb AAB19129.1
Peroxidase 1 precursor [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	<i>P. vulgaris</i>	(90) RGLDVVNQIKT (100) ***** **	91	gb AAD37427.1 AF149277_1

Fonte: Próprio autor. #ID corresponde ao número de identificação da proteína no NCBI. \*simboliza similaridade entre os resíduos dos peptídeos e aqueles depositados no banco de dados.

As peroxidases são bastante descritas na literatura como proteínas termoestáveis, ou seja, resistem a mudanças drásticas de temperatura. Analisando a figura 12, esta afirmativa se confirma para a POX100, pois mesmo aos 70 °C sua atividade apresentou boa estabilidade, conservando aproximadamente 50% da atividade A POX100 apresentou, inclusive, aumento crescente de atividade a 60 °C, durante todo o tempo de ensaio. Os resultados são semelhantes aos de outras peroxidases com alta resistência térmica como POD A de *Brassica oleracea* (THONGSOOK *et al.*, 2007) e JcGP1 de *Jatropha curcas* (CAI *et al.*, 2012). A presença de açúcares em sua estrutura pode estar associada a essa alta estabilidade (MELLON *et al.*, 1991). Entretanto, existem várias isoformas com perfis de termoestabilidade específicos, assim, esse fato não pode ser generalizado. A espécie *V. unguiculata* é amplamente distribuída em regiões quentes nos trópicos e sua capacidade de manter suas funções fisiológicas de maneira a reter a atividade da peroxidase, em destaque a POX100, sob alta temperatura, pode ser uma das razões para a elevada adaptabilidade a climas quentes.

Figura 12 - Estabilidade térmica após incubação da POX100 em diferentes temperaturas e intervalos de tempo seguida das atividades peroxidásica

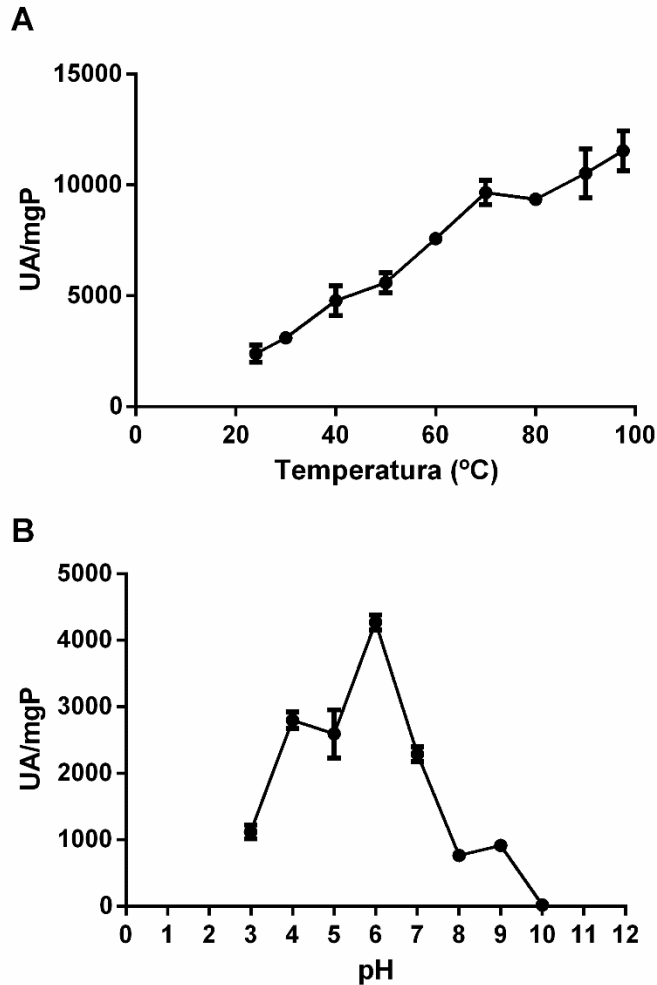


Fonte: Próprio autor. Estabilidade térmica após incubação da POX100 em temperaturas que variaram de 30 a 90 °C em diferentes tempos.

A temperatura ótima da POX100 (Figura 13) foi estimada variando 24-97 °C, aonde a atividade peroxidásica mais elevada foi à temperatura de 97 °C, confirmando sua alta resistência térmica. Além disso, a enzima foi mais ativa nos pHs próximos da neutralidade, tendo seu máximo de atividade a pH 6 e com acentuados decréscimos em extremos de pHs, chegando à inativação em pH 10. Outros trabalhos com peroxidases vegetais (FERNANDES *et al.*, 2006;

JIANG *et al.*, 2007; MIZOBUTSI *et al.*, 2010; CIVIELLO *et al.*, 1995) demonstraram ótimo de atividade, também, em pH 6. A acentuada redução de atividade da POX100 em extremos de pHs, pode resultar da ionização do grupo heme prostético e/ou mudanças conformacionais da proteína, levando-a à inativação (LOPEZ *et al.*, 1995).

Figura 13 – Temperatura (A) e pH (B) ótimos da atividade da POX100



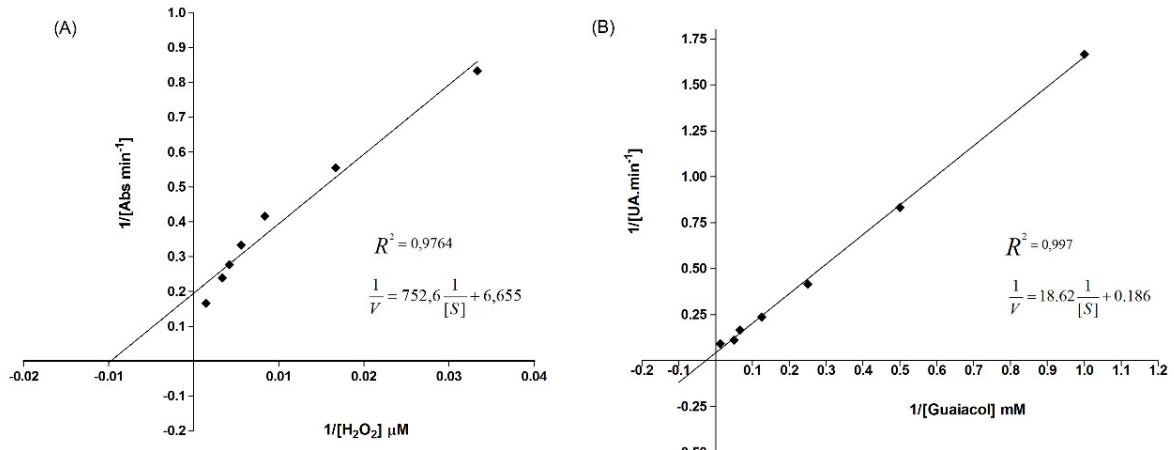
Fonte: Próprio autor. A atividade peroxidásica da POX100 ( $5,9 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ) foi medida após incubação por 3 min nas temperaturas de 24, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 97,5 °C (A) e nos pHs de 3 a 10 (B), seguida das leituras das absorbâncias à 480 nm como descrito na seção 4.6.2. Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata.

A figura 14 mostra os gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk referentes à atividade enzimática da POX100, com variadas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e quantidade de guaiacol mantida fixa (A) e com variadas concentrações de guaiacol, e quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mantida fixa (B). Em ambos os gráficos, foi constatada ótima linearização dos dados em relação a concentração dos substratos *versus* velocidade. Quando a concentração do substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi

variável (Figura 14A), o  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados a partir da equação  $y = 752,6x + 6,655$ , tendo sido encontrados os valores de 0,102 mM e 5,15 UA  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente. O  $K_m$  baixo para  $\text{H}_2\text{O}_2$  indica ótima afinidade da enzima pelo substrato. A POX100 apresentou  $K_m$  para peróxido menor que o relatado para outras peroxidases purificadas, como da peroxidase  $\text{C}_8$  (1270  $\mu\text{M}$ ) (KIM; LEE, 2005) e peroxidases A1 (2500  $\mu\text{M}$ ), A2 (1380  $\mu\text{M}$ ), A3n (1500  $\mu\text{M}$ ) e A3 (1000  $\mu\text{M}$ ) de *Raphanus sativus* (LEE; KIM, 1998), e, também, a Mo-POX, de *Marsdenia megalantha*, (4300  $\mu\text{M}$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Quando a concentração do substrato guaiacol foi variável (Figura 14B), o  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados usando a equação  $y = 18,62x + 0,186$ , tendo sido encontrados os valores de 38,75 mM e 23,52 UA  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente. O  $K_m$  para guaiacol superior ao  $K_m$  para peróxido é um perfil que se diferencia de outros trabalhos que, em geral, relatam maior afinidade da enzima por guaiacol em comparação ao peróxido (NOUREN *et al.*, 2013; SISECIOGLU *et al.*, 2010; KOKSAL, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 14 – Gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para POX100 usando concentrações variadas de peróxido de hidrogênio (A) e guaiacol (B)



Fonte: Próprio autor. Para ambos os ensaios,  $5,9 \times 10^{-2} \mu\text{g}$  de proteína foram usados, sob as condições de ensaio descritas na metodologia.

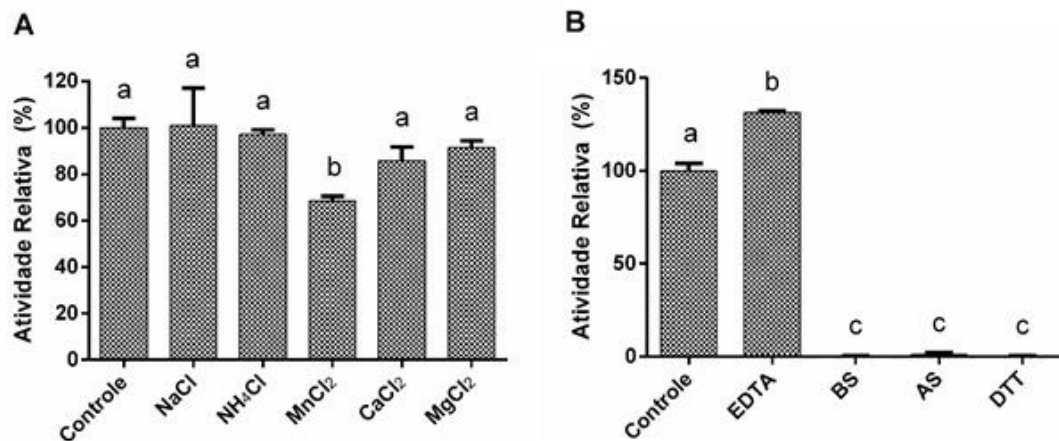
O efeito de sais e aditivos sobre a atividade peroxidásica da POX100 foi avaliado (Figura 15). Apesar de em vários trabalhos, NaCl inibir a atividade peroxidásica (OLIVEIRA *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2008), este foi capaz de aumentar levemente a atividade de POX100 (Figura 15A). Para os demais sais, POX100 apresentou resultados similares aos da MGP, uma peroxidase purificada de *Ipomea carnea* (PATEL *et al.*, 2008), com exceção de  $\text{MnCl}_2$ , que pareceu inibir, consideravelmente, a atividade de POX100.



Interessantemente, POX100 teve sua atividade aumentada na presença de EDTA, que é um agente quelante capaz de “sequestrar” vários íons metálicos presentes em solução ou acoplados às peroxidases, em específico, como relatado por Oliveira *et al.* (2017) para Mo-POX, uma peroxidase purificada de *M. megalantha*, que teve 70% de sua atividade inibida na presença deste aditivo.

A atividade da POX100 foi inibida, quase que totalmente, quando a enzima foi posta em contato com Bissulfito de sódio (BS) e, completamente, quando na presença de Azida de sódio (AS) e DTT. BS pode agir como agente oxidante, impedindo a formação de substrato pela peroxidase (BANCI, 1997). Já a azida é considerada um inibidor clássico de atividade peroxidásica *in vitro*, visto sua capacidade de reduzir o grupo heme de várias peroxidases (OLIVEIRA *et al.*, 2017). DTT é um aditivo capaz de atuar sobre as ligações dissulfeto (SANTARINO; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2012), no entanto, como visto anteriormente na figura 9, POX100 não foi separada em duas cadeias ou mais quando na presença de DTT, portanto, é possível que o aditivo tenha agido nas pontes dissulfeto intracadeia, desestabilizando a estrutura tridimensional, o que poderia explicar a perda de atividade pelo tratamento com o composto.

Figura 15 – Efeito de diferentes sais e aditivos na atividade peroxidásica da POX100

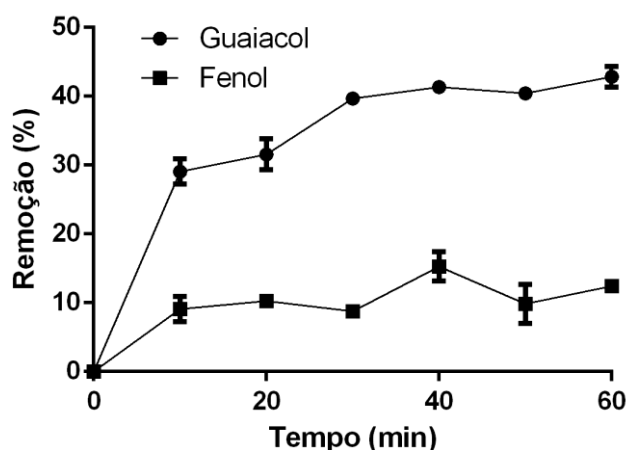


Fonte: Próprio autor. A POX100 ( $11,8 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ) foi incubada com cada sal ou aditivo durante 30 min a 30 °C. O ensaio foi feito com sais (A) e aditivos (B), todos na concentração de 0,01 M. A peroxidase pura, sem adição de qualquer sal ou aditivo, foi utilizada como controle (100%). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

### 5.3 Atividade de Remoção de Fenóis

Enzimas têm sido altamente utilizadas como biocatalisadores em reações biológicas. A remoção enzimática de compostos fenólicos já foi muito investigada e dentro destas pesquisas já foi visto que as peroxidases são capazes de reagir com os compostos fenólicos aquosos e formarem com eles materiais não solúveis que podem ser facilmente removidos a partir da fase aquosa (AITKEN, 1993; MILAND *et al.*, 1996; STANISAVLJEVIC *et al.*, 2004; ULSON DE SOUZA *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2002; BODALO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Na figura 16 são mostrados resultados dos ensaios da remoção de guaiacol e de fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O). A POX100 apresentou, nos primeiros 10 min de reação, remoção de 36,7% para guaiacol e de 9,8% para fenol. Aos 40 min, houve remoção de 46,4% de guaiacol e de 13,4% de fenol. O PEG (polietilenoglicol 6000) foi utilizado para minimizar a inativação da enzima, que é atribuída por vários pesquisadores como causa da baixa eficiência de biocatalisadores na remoção, como consequência da interação entre os radicais fenoxi (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sup>-</sup>) e o sítio ativo da enzima (LAI *et al.*, 2005). O PEG serviria para formar uma camada protetora e, assim, podia-se obter uma eficiência mais elevada da enzima, mesmo a enzima estando em baixa concentração (NAKAMOTO *et al.*, 1992). Entretanto, mesmo com a adição do reagente houve aparente inibição da POX100, visto que entre os tempos de 10 e 40 min a percentagem de remoção dos dois compostos pouco diferenciou, sugerindo que não houve uma proteção eficaz da enzima. Assim, é recomendada a repetição do ensaio analisando a concentração ideal de PEG para melhor avaliação da POX100 frente à remoção de fenóis.

Figura 16 - Efeito do tempo na remoção do guaiacol e fenol pela ação enzimática da POX100



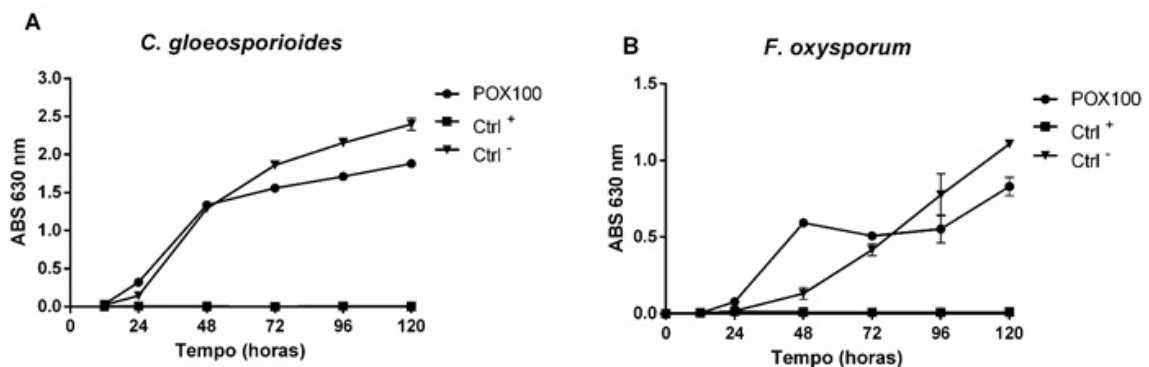
Fonte: Próprio autor. O ensaio foi conduzido nos ótimos de pH e temperatura previamente estabelecidos (6,0 e 40 °C, respectivamente). Barras indicam desvio padrão da determinação em triplicata.

## 5.4 Atividade Biológica

A POX100 se mostrou capaz de inibir, parcialmente o desenvolvimento vegetativo dos fungos *C. gloeosporioides* (Figura 17A) e *F. oxysporum* (Figura 17B). Apesar de não ter sido capaz de causar inibição total, a enzima ainda proporcionou diminuição do desenvolvimento dos fungos, em relação ao controle negativo, indicando que a proteína promoveu algum efeito deletério sobre as células fúngicas. Para *C. gloeosporioides*, no tempo de 120 h após incubação com POX100, houve redução de 21,6% no crescimento em relação ao controle (tratado com tampão) e para *F. oxysporum* 22,2% menor. A pouca inibição do crescimento vegetativo de ambos os fitopatógenos, pode ser devido à baixa concentração de amostra utilizada (0,059 µgP/µL aonde 10 µL foi utilizado), que provavelmente não foi suficiente para um resultado conclusivo do potencial antifúngico da POX100.

Mesmo que a POX100 não tenha apresentado ação marcante de inibição sobre estes fungos testados, sabe-se que a defesa contra patógenos é uma das ações constantemente atribuídas a heme peroxidases (LINDE *et al.* 2014), em que estas podem atuar na síntese de componentes estruturais, como suberina e lignina, na ligação cruzada de componentes da parede celular, reforçando-a (MARJAMAA *et al.*, 2009; DEMONT-CAULET *et al.*, 2010; FUJII *et al.*, 2013; PANDEY; DWIVEDI, 2015), contribuindo, assim, para impedir a infecção da planta pelos patógenos.

Figura 17 – Efeito da POX100 sobre o crescimento vegetativo dos fungos *C. gloeosporioides* e *F. oxysporum*



Fonte: Próprio autor. **A.** *C. gloeosporioides*. **B.** *F. oxysporum*. O ensaio foi realizado na presença de controle positivo (peróxido de hidrogênio 0,1 M), controle negativo (tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2) e POX100. Foi aplicado 2,5 µg de proteína.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível estabelecer o protocolo para purificação de uma nova isoforma de peroxidase de raízes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) denominada POX100. Adicionalmente, foi descrito a caracterização bioquímica da enzima, bem como demonstrado sua atividade inibitória do crescimento vegetativo de fungos fitopatogênicos de importância econômica e moderada atividade na remoção de fenóis.

É certo que este trabalho não foi conclusivo quanto as atividades biológicas, entretanto, abre perspectivas e caminhos para trabalhos futuros, visando melhor entendimento e possíveis aplicações dessas e de outras proteínas presentes nas raízes do feijão-de-corda.

## REFERÊNCIAS

AFIUKWA, CELESTINE, A., UBI, BENJAMIN, E., KUNERT, KARL, J., EMMANUEL, TITUS, F., AKUSU, JOSEPHINE, O. Seed protein content variation in cowpea genotypes, **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 1 (3), p. 094-099, 2013.

AGOSTINI, E.; HERNANDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B.; MILRAND, S. R.; TIGIER, H. A.; ACOSTA, M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassicanapus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application indignant kits. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, p.1–7, 2002.

AITKEN, M.D. Waste treatment applications of enzymes: Opportunities and Obstacles. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. B49–B58, 1993.

ALMAGRO, L.; GÓMEZ ROS; L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROS BARCELO, A.; PEDREN, E. M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, No. 2, p. 377–390, 2009.

AL-SENAIDY, Abdurrahman M.; ISMAEL, Mohammad A.. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.293-298, 2011.

ARUNA, N.; LALI, A. Purification of a plant peroxidase using reversibly soluble ion-exchange polymer. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 431-437, 2001.

ATHAYDE SOBRINHO, C., VIANA, F. M. P. SANTOS, A. A. dos. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina, Embrapa Meio-Norte, p. 264, 2000.

BADIANE, F.A., GOWDA, B.S., CISSÉ, N., DIOUF, D., SADIO, O., TMKO, M.P. Genetic relationship of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties from Senegal based on SSR markers. **Genetic and Molecular Research**, v. 11, p. 292-304, 2012.

BAKALOVIC, Nenad *et al.* PeroxiBase: A class III plant peroxidase database.

**Phytochemistry**, [s.l.], v. 67, n. 6, p.534-539, 2006.

BALASUBRAMANIAN, M.; BOOPATHY, R. Purification and characterization of peroxidases from liquid endosperm of *Cocos nucifera* (L.): **Biotransformation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 33-42, 2013.

BANCI, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**. v. 53, n. 2-3, p. 253-263, 1997.

BARRETO, A. L. H., VASCONCELOS, I. M., GRANGEIRO, T. B., MELO, V. M. M., MATOS, T. E., ELOY, Y. R. G., FERNANDES, C. F., TORRES, D. C., FREIRE-FILHO, F. R., FREIRE, F. C. O., OLIVEIRA J. T. A. I Infection Process and Host Defense Responses in Compatible and Incompatible Interactions Between Cowpea [*Vigna unguiculata*] and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 168, p. 193–211, 2005.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32-37, January 2010.

BOUKAR, Ousmane *et al.* Cowpea. **Genetic And Genomic Resources Of Grain Legume Improvement**, [s.l.], p.137-156, 2013.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRESLOW, Ronald. Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design. **Accounts Of Chemical Research**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.146-153, 1995.

CAI, F.; OUYANG, C.; DUAN, P.; SHUN GAO, XU, Y.; CHEN, F. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 59–66, 2012.

CHEN, H *et al.* Genetic diversity and a population structure analysis of accessions in the Chinese cowpea [ *Vigna unguiculata* (L.) Walp.] germplasm collection. **The Crop Journal**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.363-372, 2017.

DAMASCENO, S. K. J.; MOURA, R. M.; MENEZES-JÚNIOR, J. A. N. Socioeconomia. *In: A Cultura do Feijão-Caupi no Brasil*. Cap. 1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Embrapa Meio-Norte, Teresina – PI, 2016.

DE SOUZA, S.M.A.G.U., FORGIARINI, E., & DE SOUZA, A.A.U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p.1073–1078, 2007.

DEMONT-CAULET, N.; LAPIERRE, C.; A, JOUANIN, L.; BAUMBERGER, S.; MÉCHIN, V. Arabidopsis peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: Kinetics of an endwise process. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1673–1683, 2010.

DUBROVSKAYA, E. *et al.* Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: Catalytic properties and involvement in PAH degradation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 169, p.224-232, 2017.

EDMAN, P. Method for determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p.283–293, 1950.

EMBRAPA Arroz e Feijão. Dados da produção de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Brasil (1985 a 2014): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2015.

Disponível em < [www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm).> Acesso: 30 julho 2017.

FAO. FAOSTAT Crops. Cowpeas, dry, 2015. Disponível em:  
<<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso: 18 nov 2017.

FATIMA, A.; HUSAIN, Q.; KHAN, R. H.. A peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*) with enhanced stability against organic solvent and detergent: A comparison with horseradish peroxidase. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 47, n. 1-2, p.66-71, 2007.

- FAWAL, N. *et al.* PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, D441-D444, 2013.
- FREIRE, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. Feijão Caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. **Embrapa Meio Norte**, Teresina, p. 84, 2011.
- FREIRE, M. das G. M. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 20. p. 60-68, 2002
- FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 (2), p. 70-476, 2008.
- FUJII, K., UEREMA, M., HAYAKAWA, C., FUNAKAWA, S., KOSAKI, T. Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 109-115, 2013.
- GAJHEDE, Michael *et al.* Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. **Nature Structural Biology**, [s.l.], v. 4, n. 12, p.1032-1038, 1997.
- GHOLAMI-BORUJENI, F.; NEJATZADEH-BARANDOZI, F.; MAHVI, A. H. Application of low purity horseradish peroxidase enzyme to removal of oil from oily wastewater. **Desalination And Water Treatment**, [s.l.], v. 57, n. 42, p.19760-19767, 2015.
- GUPTA, Nikesh *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase (HRP): synthesis, characterization and carrier for the generation of free radicals for potential applications in cancer therapy. **Rsc Adv.**, [s.l.], v. 6, n. 112, p.111099-111108, 2016.
- HALL A.E. Breeding for adaptation to drought and heat in cowpea. **European Journal of Agronomy** v.21 p. 447–454, 2004.



HALL A.E., *et al.* Breeding cowpeas for tolerance to temperature extremes and adaptation to drought. **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Nigeria, p.14–21, 2002.

HAMID, Mohsina; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 115, n. 4, p.1177-1186, ago. 2009.

HAMID, R. G. Correlation between acid, TBA, peroxide and iodine values, catalase and glutathione peroxidase activities of chicken, cattle and camel meat during refrigerated storage. **Veterinary World**. v. 4, n. 4, p. 153-157, 2011.

HENRIKSEN, A. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. **Protein Science**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.108-115, 2001.

HENRIKSEN, A.; WELINDER, K. G.; GAJHEDE, M.. Structure of Barley Grain Peroxidase Refined at 1.9-Å Resolution. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 4, p.2241-2248, 1998.

HERRERO, Joaquín; ESTEBAN-CARRASCO, Alberto; ZAPATA, José Miguel. Looking for Arabidopsis thaliana peroxidases involved in lignin biosynthesis. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 67, p.77-86, 2013.

HIRAGA, S.; SASAKI K.; ITO H.; OHASHI Y.; MATSUI H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, p. 462–468, 2001.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley** v. 2347, p. 139,1950.

HUSAIN, Q.. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews In Environmental Science And Bio/technology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.117-140, 2009.

JIANG, Fei *et al.* Effects of pH and Temperature on Recombinant Manganese Peroxidase Production and Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 146, n. 1-3, p.15-27, 2007.

JULSING, M. K. *et al.* Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts?. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.177-186, 2008.

KHATUN, S. *et al.* PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM MORINGA OLEIFERA L. LEAVES. **Bio Resources**. v. 7, n. 3, 2012.

KENDALL, C. W.; ESFAHANI, A.; JENKIS, D. J. A. The link between dietary fibre and human health. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 42-48, 2010.

KIM, S. S.; LEE, D. J. Purification and characterization of a cationic peroxidase in *Raphanus sativus*. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 162, n. 6, p.609-617, 2005.

KOKSAL, E. Peroxidase from Leaves of Spinach (*Spinacia oleracea*): Partial Purification and Some Biochemical Properties. **International Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.135-139, 2011.

KOTB, E. Characterization of a Thermostable Uricase Isolated from *Bacillus firmus* DWD-33 and its Application for Uric Acid Quantification in Human Serum. **Protein & Peptide Letters - Bentham Science Publishers**, v. 22, n. 5, p. 402-409, 2015.

KOTCHEY, G. P. *et al.* Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 65, n. 15, p.1921-1932, 2013.

KOTOV, N. A. Inorganic Nanoparticles as Protein Mimics. **Science**, [s.l.], v. 330, n. 6001, p.188-189, 2010.

KOUA, D. *et al.* PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 37, p.D261-D266, 2009.

KUMAR, R. *et al.* Biochemical characterization of a peroxidase isolated from Caribbean plant: *Euphorbia cotinifolia*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.1350-1357, 2011.

LAI, Y.C.; LIN, S.C., Application of Immobilized Horseradish Peroxidase for the Removal of p-chlorophenol from Aqueous Solution, **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1167, 2005.

LEE, Y. M.; KIM, S. S. Characteristics of six isoperoxidases from Korean Radish Root. **Phytochemistry**, v. 35, p. 287-290, 1994.

LI, Dongyang *et al.* Comparison of monomeric and polymeric horseradish peroxidase as labels in competitive ELISA for small molecule detection. **Microchimica Acta**, [s.l.], v. 180, n. 7-8, p.711-717, 2013.

LINDE, D. *et al.* Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 103, p.28-37, nov. 2014.

LISZKAY, A.; E. VAN DER ZALM.; P. SCHOPFER, Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth, **Plant Physiology**, v. 136, p. 3114-3123, 2004.

LÓPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 291-337,2001.

LÜTHJE, Sabine *et al.* Phylogeny, topology, structure and functions of membrane-bound class III peroxidases in vascular plants. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 10, p.1124-1135, jul. 2011.

MAGARIO, I. *et al.* Mechanisms of radical generation in the removal of phenol derivatives and pigments using different Fe-based catalytic systems. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical**, [s.l.], v. 352, p.1-20, jan. 2012.

MANU, B. T.; PRASADA RAO, U. J. S. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 114, p. 66-71, 2009.

MARJAMAA, K.; KUKKOLA, E.M.; FAGERSTEDT, K.V. The role of xylem class III peroxidases in lignification, **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 367 e 376, 2009.

MINIBAYEVA, F., BECKETT, R. P., KRANNER, I. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. **Phytochemistry**, v. 112, p. 122-129, 2015.

MARTÍNEZ-CORTÉS, Teresa *et al.* Purification and kinetic characterization of two peroxidases of *Selaginella martensii* Spring. involved in lignification. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p.130-139, 2012.

NOUREN, S., BHATTI, H. N., BHATTI, I. A., ASGUER, M. Kinetic and thermal characterization of peroxidase from peels of *citrus reticulata* var. *kinnow*. **The Journal of Animal & Plant Sciences**. v. 23, n. 2, p. 430 - 435, 2013.

OGUCHI, T.; TAWAKI, S.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Soluble polyphenol. **Macromolecular Rapid Communication**, v.20, p.401–403, 1999.

OLIVEIRA, Henrique P. *et al.* A novel peroxidase purified from *Marsdenia megalantha* latex inhibits phytopathogenic fungi mediated by cell membrane permeabilization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 96, p.743-753, 2017.

ØSTERGAARD, Lars *et al.* Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.231-243, 2000.

PADULOSI, S.; NG N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N., eds. **Advances in Cowpea Research**. Tsukuba; IITA JIRCAS, p.1-12, 1997.

PANDEY, V. P., DWIVEDI, U. N. A ripening associated peroxidase from papaya having a role in defense and lignification: Heterologous expression and in-silico and in-vitro experimental validation, **Gene**, v. 555, p. 438-447, 2015.

PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N.. Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.168-173, 2011.

PASSARDI, F. *et al.* Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p.255-265, 2005. Springer Nature.

PASSARDI, Filippo *et al.* Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, [s.l.], v. 89, n. 5, p.567-579, 2007.

PATEL, A. K. *et al.* Biochemical and Spectroscopic Characterization of Morning Glory Peroxidase from an Invasive and Hallucinogenic Plant Weed *Ipomoea carnea*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 19, p.9236-9245, 8 out. 2008.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f.sp. phaseoli em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 296-300,1996.

SANTARINO, I. B.; OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl) phosphine anodic oxidation. **Electrochemistry Communications**, [s.l.], v. 23, p.114-117, set. 2012.

SARAIVA, J; NUNES, C; COIMBRA, M. Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p.1571-1579, 2007.

SCHULLER, David J *et al.* The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.311-321, 1996.

SEGURA-CAMPOS, Maira *et al.* Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. **Cyta - Journal Of Food**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.208-215, 2013

SHEKOOHIYAN, Sakine; MOUSSAVI, Gholamreza; NADDAFI, Kazem. The peroxidase-mediated biodegradation of petroleum hydrocarbons in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SBR using in-situ production of peroxidase: Biodegradation experiments and bacterial identification. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 313, p.170-178, 2016.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SHOJI, E.; FREUND, M. S. Potentiometric Sensors Based on the Inductive Effect on the pKa of Poly(aniline): A Nonenzymatic Glucose Sensor. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 123, n. 14, p.3383-3384, 2001.

SI, J.; BAO-KAI-CUI. A new fungal peroxidase with alkaline-tolerant, chloride-enhancing activity and dye decolorization capacity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 6-14, 2013.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, **Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, M.C.; TORRES, J.A.; SÁ, L.R.V.; CHAGAS, P.M.B.; FERREIRA-LEITAO, V..S.; CORRÊA, A.D. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 122-129, 2013.

SILVEIRA, J. A. G., COSTA, R. C. L., OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187-194, 2001.

SINGH, B. B. Recent Progress in cowpea genetics and breeding. **Acta Horticulture**, v. 752 (13), p. 69-75, 2007.

SINGH, S. N. (Ed.). **Environmental Science and Engineering: Microbial Degradation of Xenobiotics**. 1. ed. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. 482 p.

SMULEVICH, G *et al.* Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.568-585, 2006.

STEEL, W. M., ALLEN, D.J., SUMMERFIELD, R. J. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **J. Food Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 520-538, 1985.

STEEVENSZ, Aaron *et al.* Crude soybean hull peroxidase treatment of phenol in synthetic and real wastewater: Enzyme economy enhanced by Triton X-100. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 55, p.65-71, 2014.

TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., FERNANDEZ-RIVERA, S., PETERS, M., SMITH, J. W., SCHUTZE-KRAFT, R., AJEIGBE H. A. Optimizing the contribution of cowpea to food and fodder production in crop-livestock systems in West Africa. **Proceedings of the International Grassland Congress, Canada**, 53-54, 1997a.

TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., PETERS, M., BLADE, S. F. Cowpea haulms as fodder. In: B.B. Singh, D.R. Mohan Raj, K. Dashiell and L.E.N. Jackai (eds) **Advances in Cowpea Research. Co-publication of International Institute of Tropical Agricultural Sciences and the JIRCAS, IITA, Ibadan, Nigeria**, 313-325, 1997b.

THONGSOOK, T.; WHITAKER, J. R.; SMITH, G. M.; BARRETT, D. M. Reactivation of Broccoli Peroxidases: Structural Changes of Partially Denatured Isoenzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1009–1018, 2007.

URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43-50,1991.

WATANABE, Leandra *et al.* Crystal structure and statistical coupling analysis of highly glycosylated peroxidase from royal palm tree (*Roystonea regia*). **Journal Of Structural Biology**, [s.l.], v. 169, n. 2, p.226-242, 2010.

WAWIRE, M.; OEY, I.; MATHOOKO, F. M.; NJOROGI, C. K.; SHITANDA, D.; SILA, D.; HENDRICKX, M. Effect of harvest age and thermal processing on poly-g-glutamate folates and minerals in African cowpea leaves (*Vigna unguiculata*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 25, p. 160–165, 2012.

WELINDER, K.G. Super family of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, p. 388–393, 1992.

WILBERG, Katia; ASSENHAIMER, Cristhiane; RUBIO, Jorge. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 77, n. 7, p.851-857, 2002.

ZÁMOCKÝ, Marcel *et al.* Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 574, p.108-119, maio 2015.

ZÁMOCKÝ, Marcel *et al.* Turning points in the evolution of peroxidase–catalase superfamily: molecular phylogeny of hybrid heme peroxidases. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 71, n. 23, p.4681- 4696, 2014.

ZÁMOCKÝ, Marcel; OBINGER, Christian. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. **Biocatalysis Based On Heme Peroxidases**, [s.l.], p.7-35, 2010.

ZIPOR, G.; OREN-SHAMIR, M. Do vacuolar peroxidases act as plant caretakers?, **Plant Science**, Volumes 199–200, Pages 41-47, 2013.